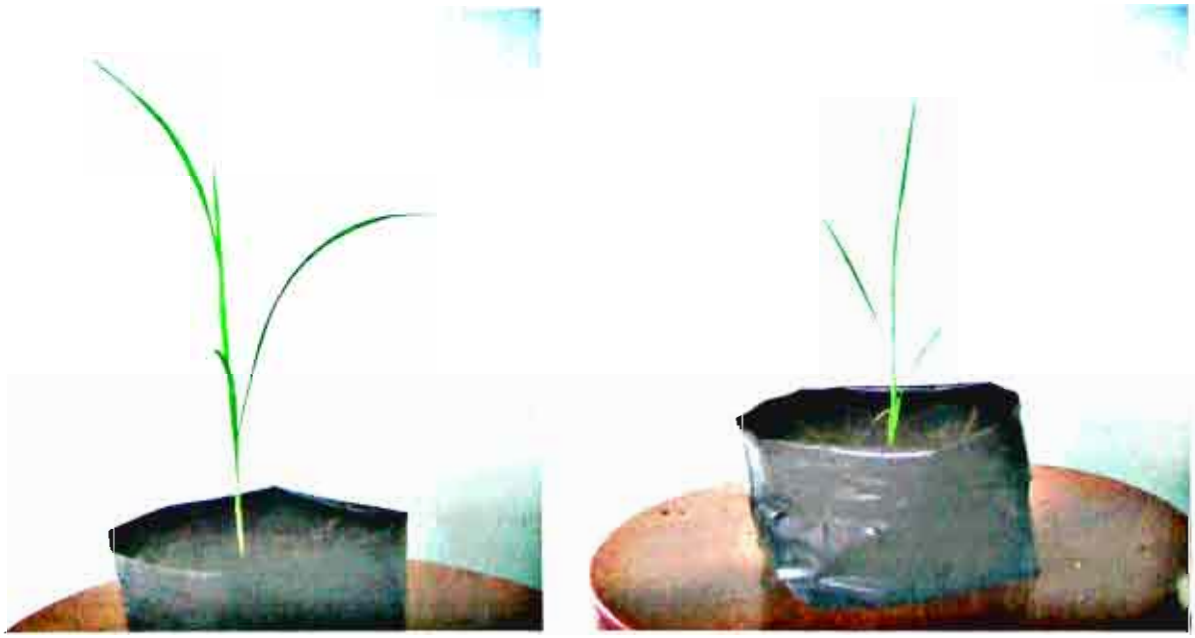


(ก) (ข)

ภาพที่ 4.18 ต้นข้าวที่เพาะลงดินในที่สว่างเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีลำต้น
(ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกชิฮิการิ

แคลลัสที่ได้รับการถ่ายยีนไคติเนส

จากการศึกษาการชักนำเมล็ดข้าวหอมดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ โดยเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB medium ที่เติม 2,4-D โดยเพาะเลี้ยงไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ข้าวดอกมะลิ 105 ที่มีการถ่ายยีน pCAMBIA 1300 และ pCAMBIA 1301 สำหรับเป็นตัวควบคุม จะมีแคลลัสเจริญและงอกรากเท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียวเท่ากับ 36 เปอร์เซ็นต์ ส่วนยีน pCAMBIA 1300 ที่มียีน chitinase แทรกอยู่จะมีแคลลัสเจริญและงอกรากเท่ากับ 54.67 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียวเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.3 – 4.4 และภาพที่ 4.19- 4.22

ส่วนของข้าวโกชิฮิการิที่มีการถ่ายยีน pCAMBIA 1300 และ pCAMBIA 1301 สำหรับเป็นตัวควบคุม จะมีแคลลัสเจริญและงอกรากเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดจุดสีเขียวเท่ากับ 26 เปอร์เซ็นต์ และยีน pCAMBIA 1300+Chitinase แคลลัสที่เกิดรากเท่ากับ 42.67 เปอร์เซ็นต์ แคลลัสที่เกิดจุดสีเขียวเท่ากับ 22 เปอร์เซ็นต์ ดังที่แสดงในตารางที่ 4.5 – 4.6 และภาพที่ 4.19, 4.22

ตาราง 4.3 จำนวนแคลลัสข้าวดอกมะลิ 105 ที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300 และ pCAMBIA 1301

ครั้งที่	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสที่เกิดราก	จำนวนแคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียว
1	100	50	38
2	100	60	36
3	100	55	34
	เฉลี่ย	55	36

ตาราง 4.4 จำนวนแคลลัสข้าวดอกมะลิ 105 ที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300+Chitinase

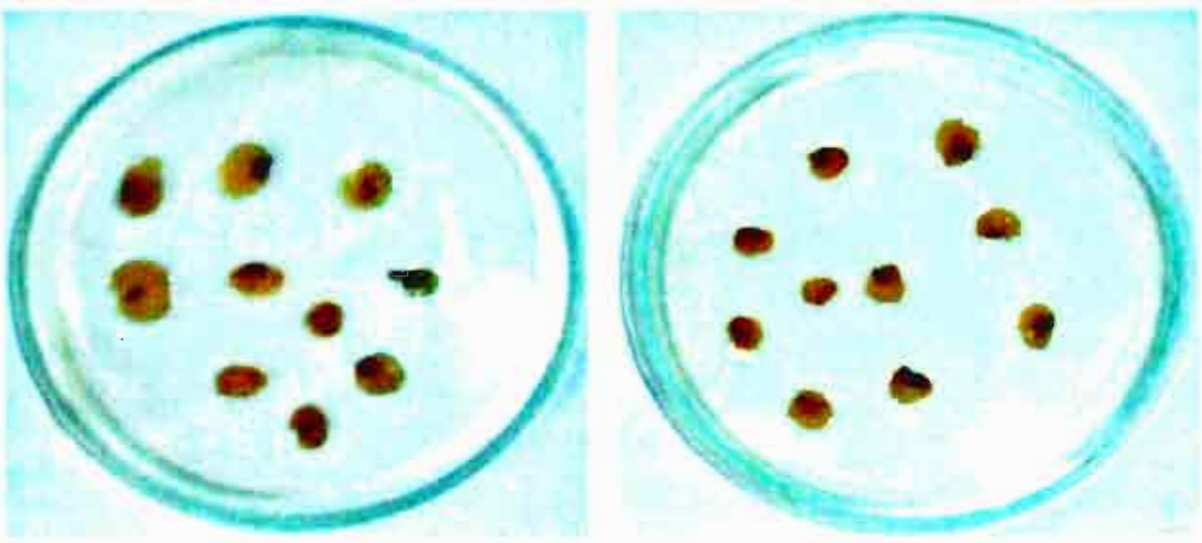
ครั้งที่	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสที่เกิดราก	จำนวนแคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียว
1	100	60	38
2	100	50	30
3	100	54	32
	เฉลี่ย	54.67	30

ตาราง 4.5 จำนวนแคลลัสข้าวโกชิฮิการิ ที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300 และ pCAMBIA 1301

ครั้งที่	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสที่เกิดราก	จำนวนแคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียว
1	100	50	26
2	100	52	28
3	100	48	24
	เฉลี่ย	50	26

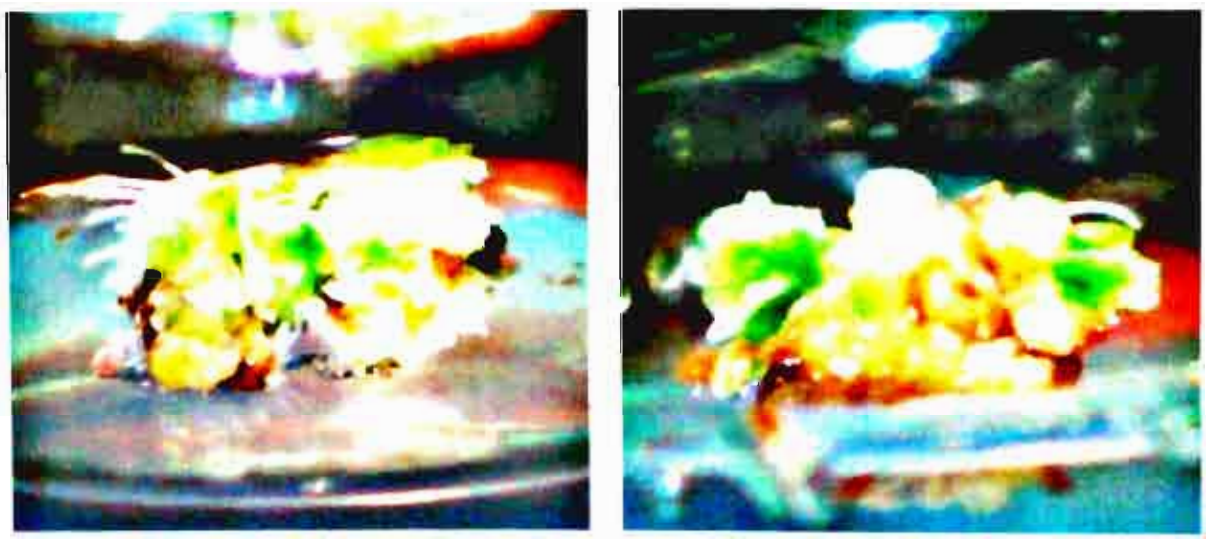
ตาราง 4.6 จำนวนแคลลัสข้าวโกชิฮิการิ ที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300 + Chitinase

ครั้งที่	จำนวนแคลลัส	จำนวนแคลลัสที่เกิดราก	จำนวนแคลลัสที่เกิดการงอกของต้นสีเขียว
1	100	42	24
2	100	40	22
3	100	46	20
	เฉลี่ย	42.67	22



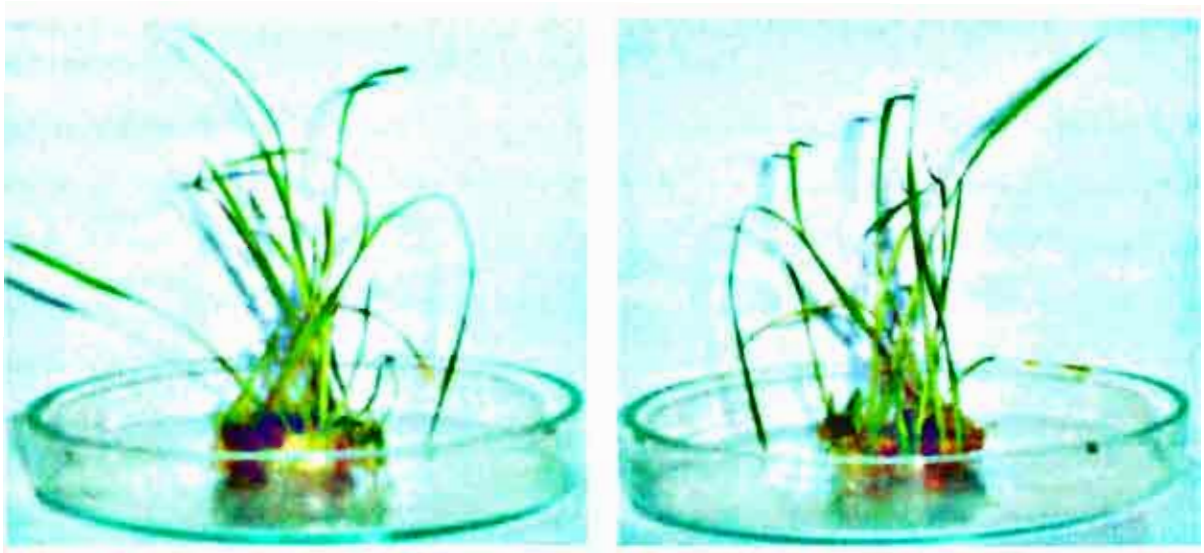
(ก) (ข)

ภาพที่ 4.19 แคลลัสข้าวที่ทำการถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร 2NB เป็นเวลา 5 สัปดาห์
(ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกชิฮิการิ



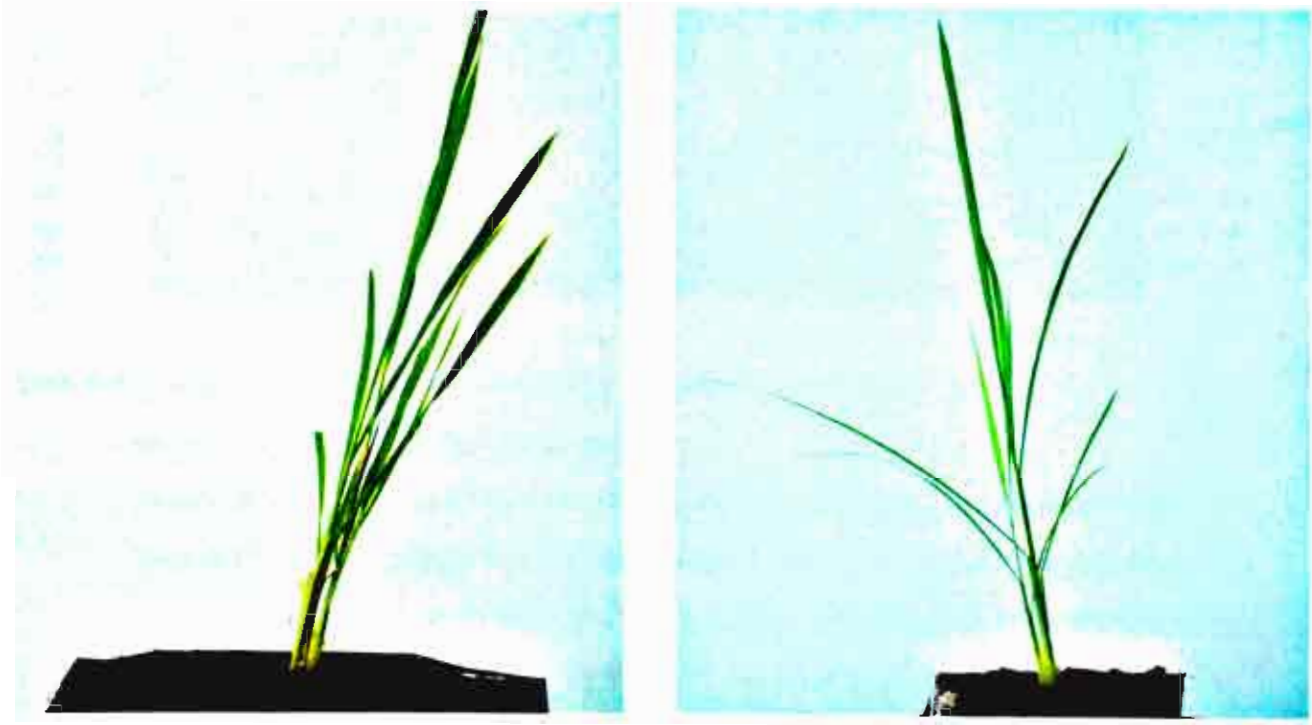
(ก) (ข)

ภาพที่ 4.20 แคลลัสข้าวที่ทำการการถ่ายยีนและเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร RN เป็นเวลา 8 สัปดาห์
(ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกชิฮิการิ



(ก) (ข)

ภาพที่ 4.21 ต้นข้าวที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร RN ในที่สว่างเป็นเวลา 10 สัปดาห์ มีลำต้น (ก) คอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกชิฮิการิ

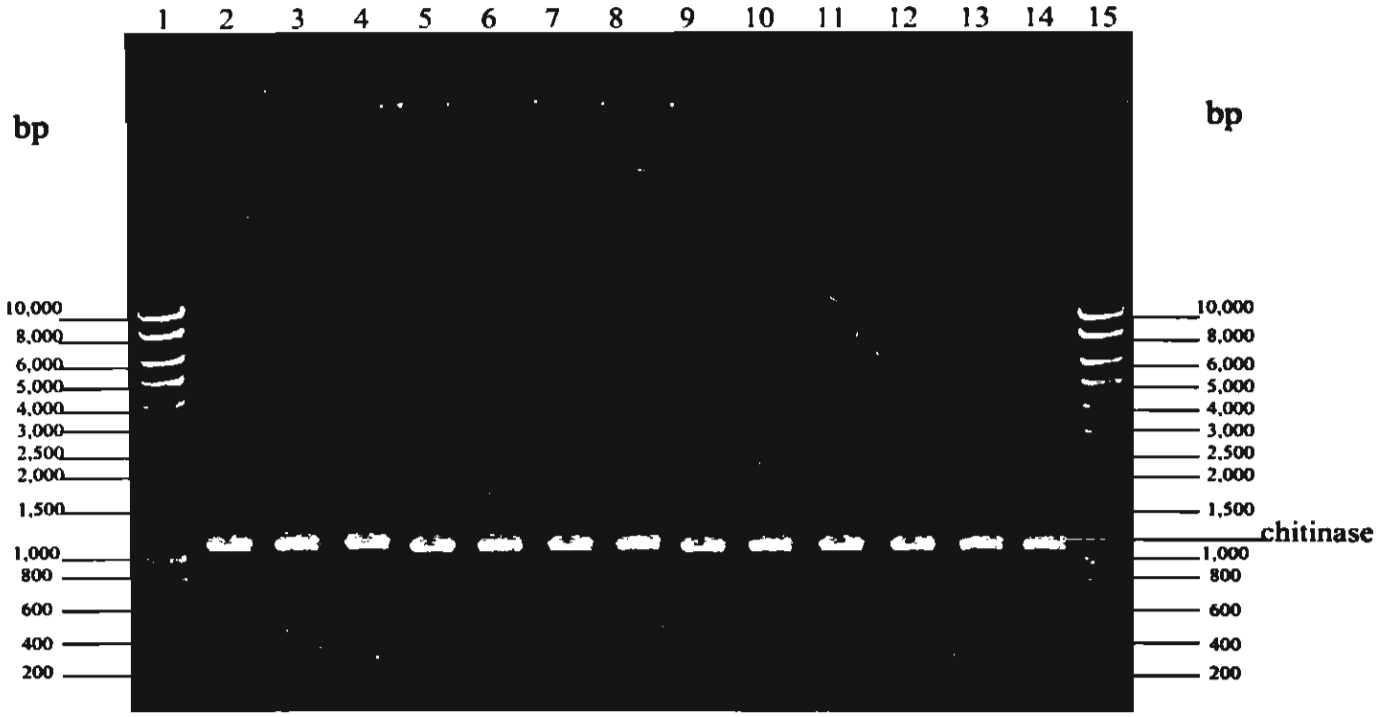


(ก) (ข)

ภาพที่ 4.22 ต้นข้าวที่เพาะลงดินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (ก) ข้าวคอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกชิฮิการิ

ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสโดยใช้วิธี PCR

จากการนำราก ต้น และใบ ของต้นข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ ที่มีอายุ 1, 2, 3 และ 4 เดือน ซึ่งถูกถ่ายยีนไคติเนสเข้าไป มาสกัด DNA แล้วนำไปเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกมียีนไคติเนสในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว พบว่ามีการแสดงออกทุกบริเวณของต้นข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิคือ ในราก ต้น และใบ ในทุก 1, 2, 3 และ 4 เดือน ดังภาพที่ 4.23 และภาพที่ 4.24



ภาพที่ 4.23 ขนาดแบนด์ของไคติเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวดอกมะลิ 105

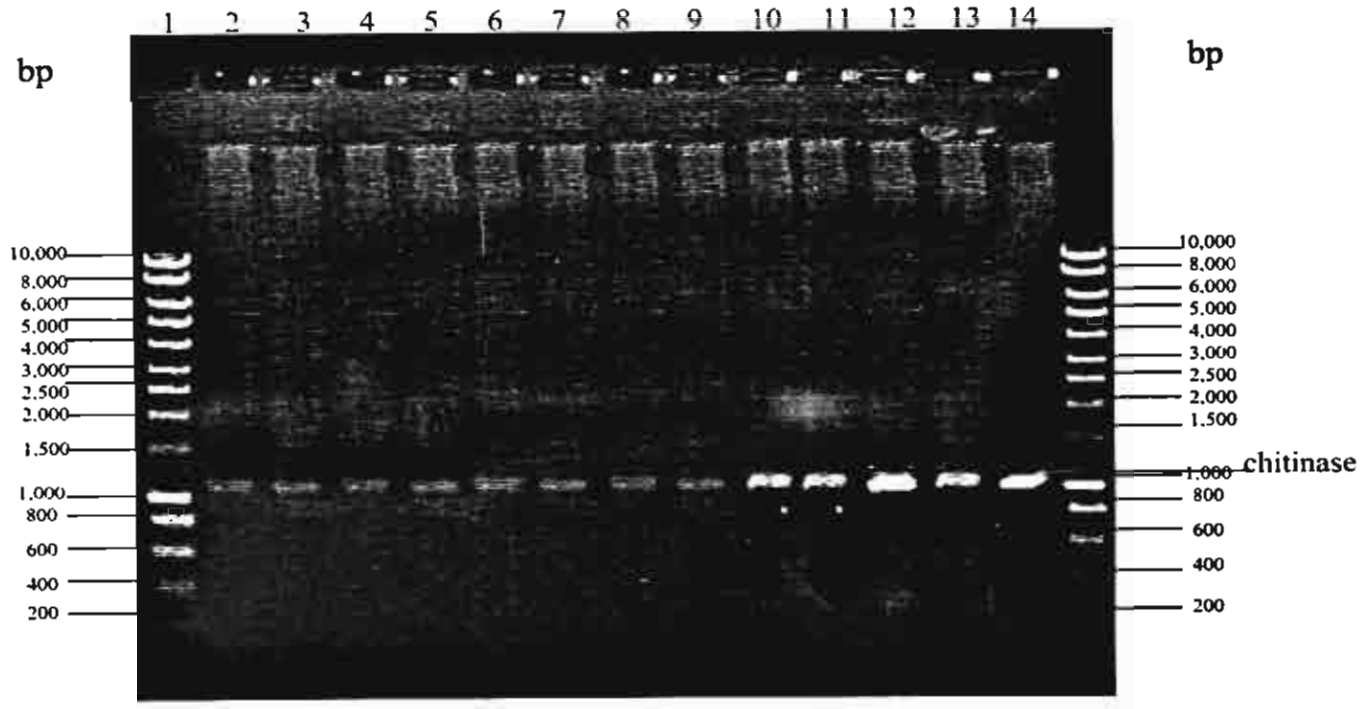
Lane 1, 15: HyperLadder I DNA marker

Lane 2-4: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 1 เดือน ตามลำดับ

Lane 5-7: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 2 เดือน ตามลำดับ

Lane 8-10: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 3 เดือน ตามลำดับ

Lane 11-14: PCR product ของ ราก ลำต้น ใบ และเมล็ดของข้าวอายุ 4 เดือน ตามลำดับ



ภาพที่ 4.24 ขนาดแบนด์ของไคติเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าวโกชิฮิการิ

Lane 1, 15: HyperLadder I DNA marker

Lane 2-4: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 1 เดือน ตามลำดับ

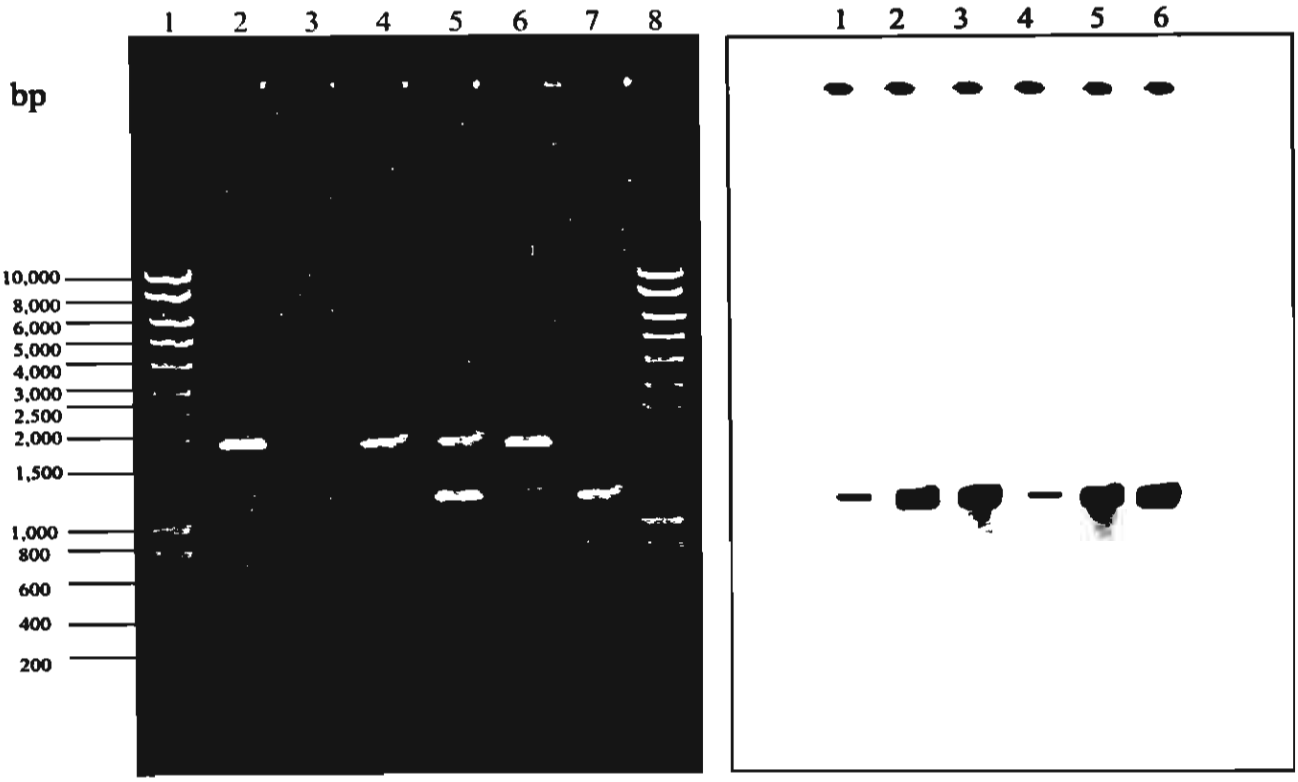
Lane 5-7: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 2 เดือน ตามลำดับ

Lane 8-10: PCR product ของ ราก ลำต้น และใบ ของข้าวอายุ 3 เดือน ตามลำดับ

Lane 11-14: PCR product ของ ราก ลำต้น ใบ และเมล็ด ของข้าวอายุ 4 เดือน ตามลำดับ

ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสโดยใช้วิธี Northern blot

จากการนำราก ต้น และใบ ของต้นข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิที่มีอายุ 1, 2, 3 และ 4 เดือน ซึ่งถูกถ่ายยีนไคติเนสเข้าไป มาสกัด DNA แล้วนำไปไฮบริไดเซชันกับ probe ที่เตรียมมาจากลำดับเบส DNA ของไคติเนส DNA เพื่อตรวจสอบการแสดงออกมียีนไคติเนสขนาดประมาณ 1,100 bp ในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว พบว่ามีการแสดงออกทุกบริเวณของต้นข้าว คือ ในราก ต้น และใบ ในทุก 1, 2, 3 และ 4 เดือนรวมทั้งในเมล็ด แต่ในรากจะมีการแสดงออกน้อยที่สุด ส่วนต้น ใบ และเมล็ดจะมีการแสดงออกใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 4.25-4.28



ภาพที่ 4.25 RNA bloting gel ของไคติเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) RNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิฮิการิ 105 อายุ 1 เดือน ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

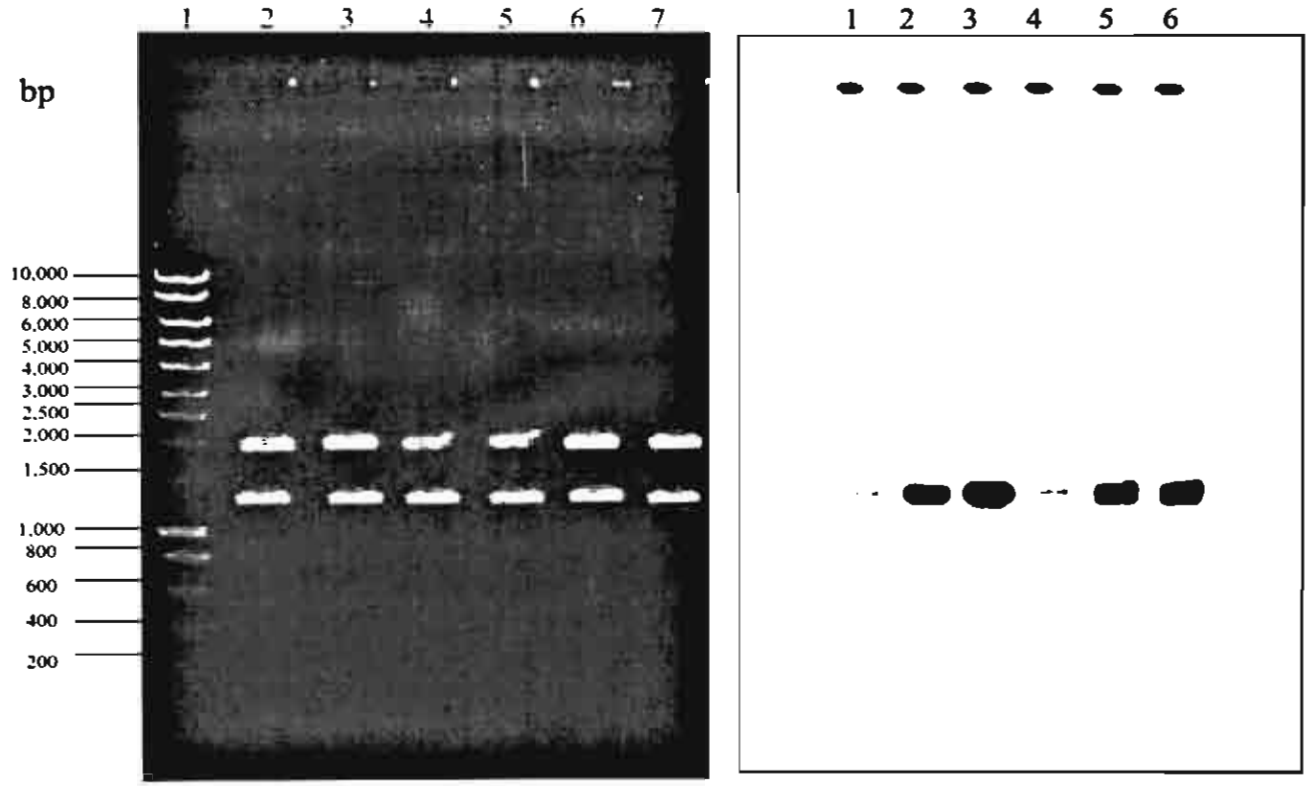
Lane 2-4: RNA จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-7: RNA จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

(ข) RNA bolting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ อายุ 1 เดือน

Lane 1-3: RNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: RNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.26 RNA bloting gel ของไคติเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) RNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิฮิการิ 105 อายุ 2 เดือน ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

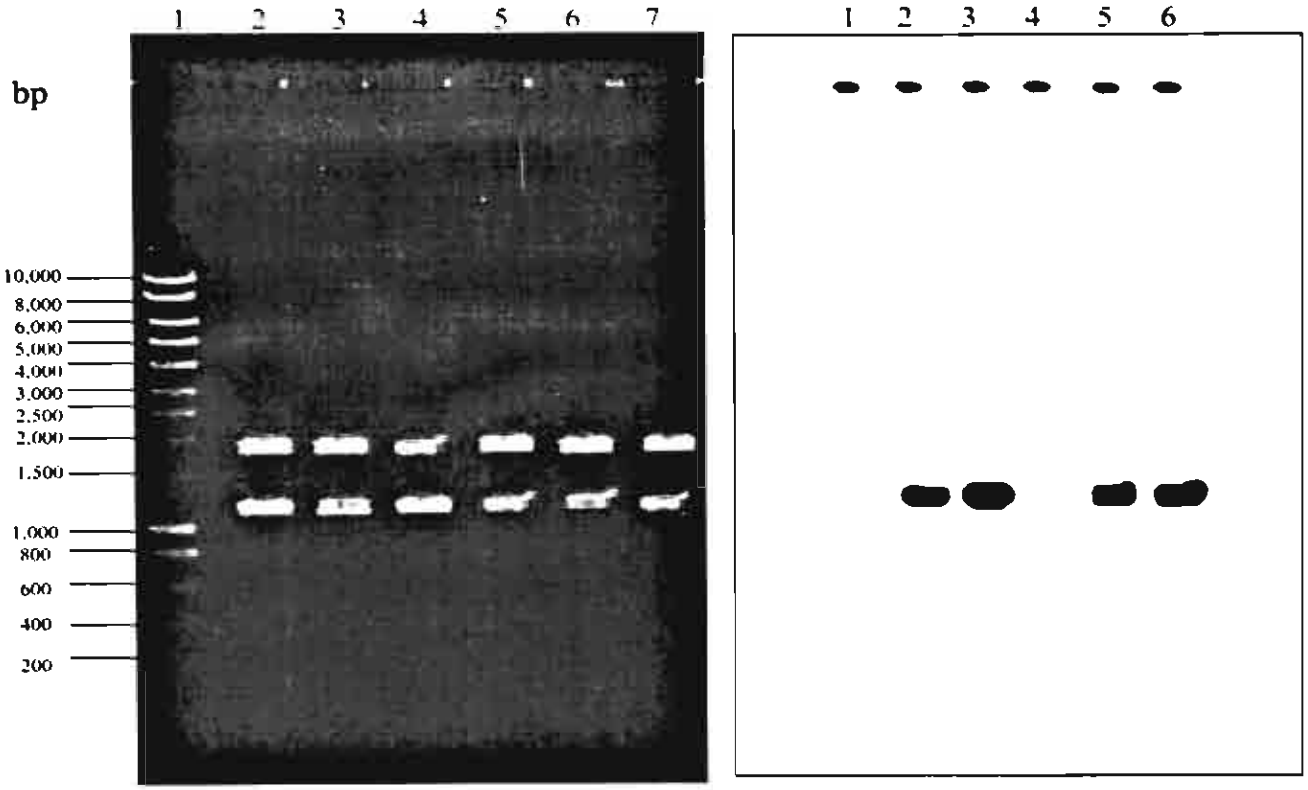
Lane 2-4: RNA จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-7: RNA จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

(ข) RNA bolting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ อายุ 2 เดือน

Lane 1-3: RNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: RNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.27 RNA bloting gel ของไคติเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) RNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิฮิการิ 105 อายุ 3 เดือน ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

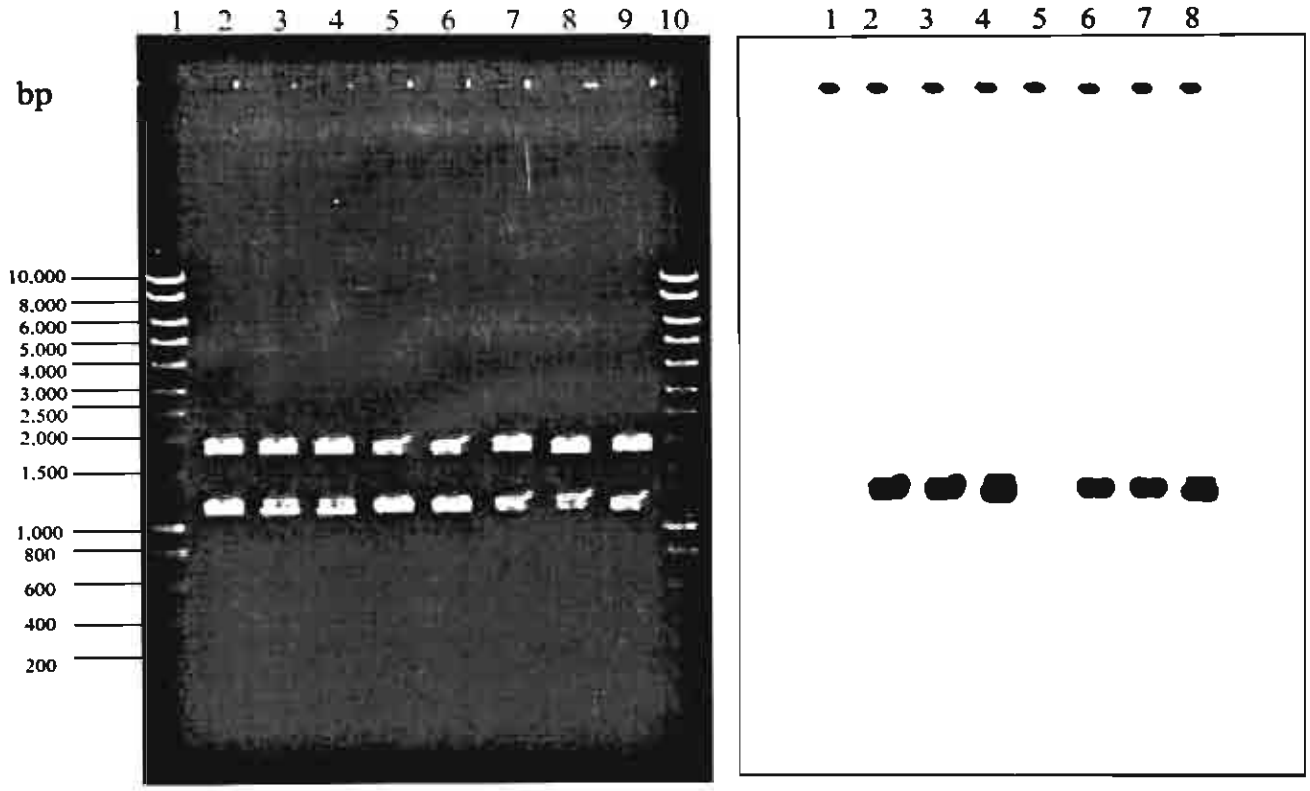
Lane 2-4: RNA จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-7: RNA จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

(ข) RNA bolting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ อายุ 3 เดือน

Lane 1-3: RNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: RNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.28 RNA bloting gel ของไคติเนสจากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) RNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิฮิการิ 105 อายุ 4 เดือน ที่ย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 10: Ladder I DNA maker

Lane 2-5: RNA จากราก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 6-9: RNA จากราก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

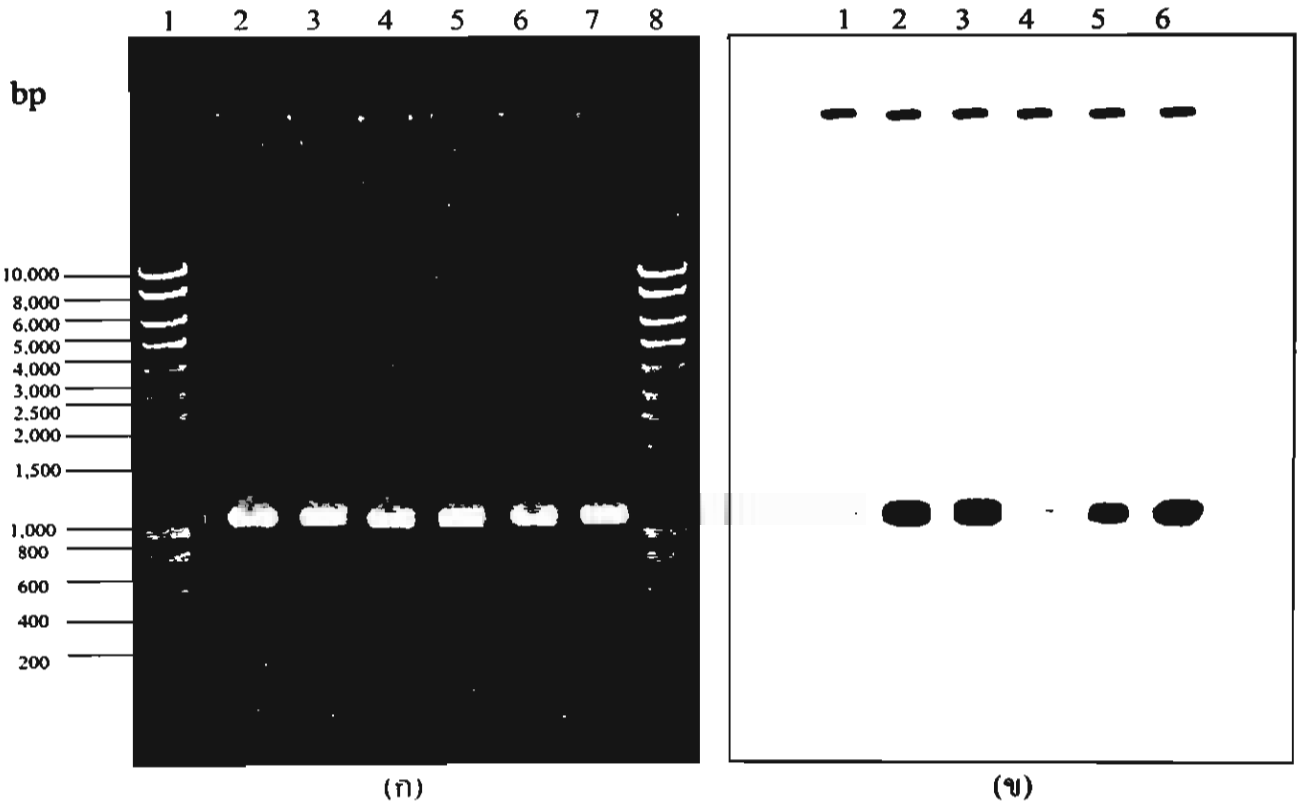
(ข) RNA bolting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ อายุ 4 เดือน

Lane 1-4: RNA bolting gel จากราก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-8: RNA bolting gel จากราก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

ผลการทดสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสโดยใช้วิธี Southern blot

ในนำราก ต้น และใบ ของข้าวที่มีอายุ 1, 2, 3 และ 4 เดือน ที่ถูกถ่ายยีนไคติเนส เมื่อสกัด RNA แล้วนำไปไฮบริไดเซชันกับ probe ที่เตรียมมาจาก DNA ของไคติเนส เพื่อตรวจสอบการแสดงออกมียีนไคติเนสขนาดประมาณ 1,100 bp ในส่วนต่างๆ ของต้นข้าว พบว่ามีการแสดงออกทุกบริเวณ คือในราก ต้น และใบ จากข้าวอายุ 1, 2 , 3 และ 4 เดือน รวมทั้งในเมล็ด แต่ในรากจะมีการแสดงออกน้อยที่สุด ส่วนต้น ใบ และเมล็ดจะมีการแสดงออกมาก ดังภาพที่ 4.29-4.32



ภาพที่ 4.29 DNA bloting gel ของ chitinase จากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) DNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิฮิการิ 105 อายุ 1 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I แล้วย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

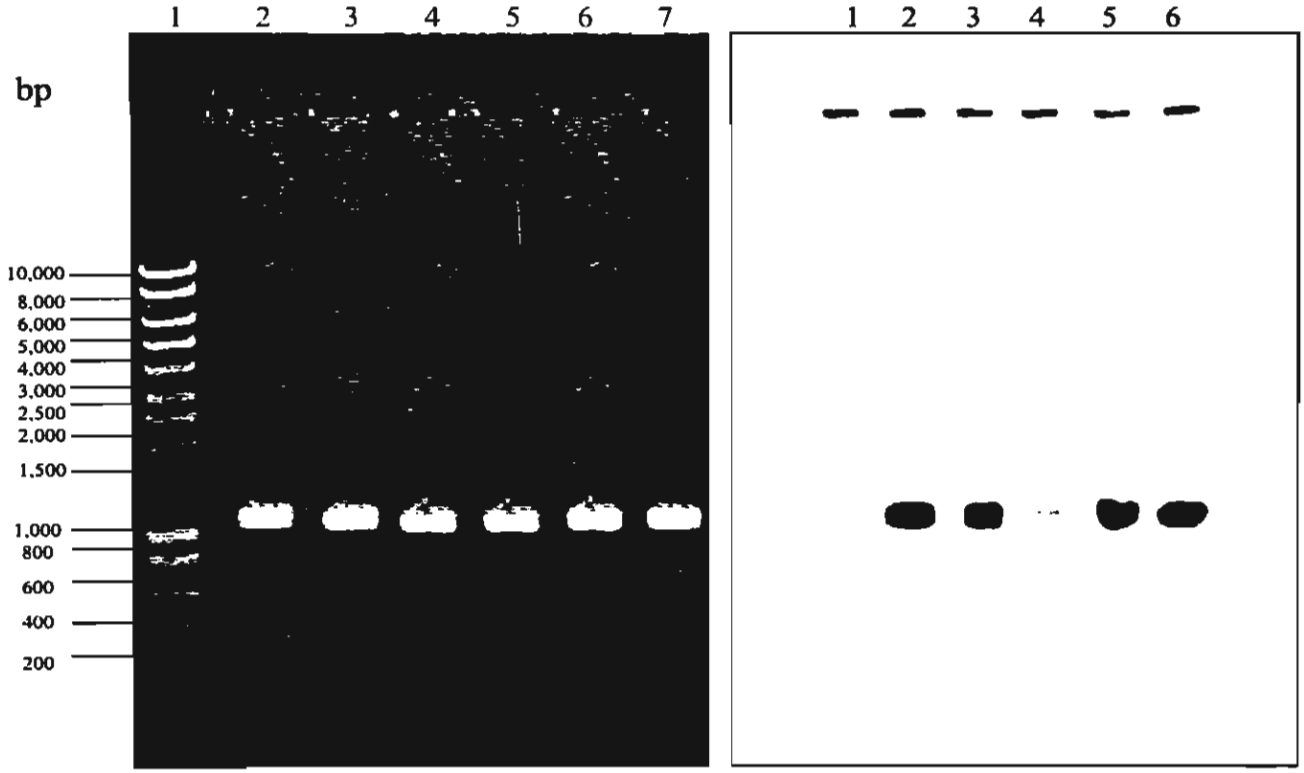
Lane 2-4: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-7: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

(ข) DNA bolting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ อายุ 1 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I

Lane 1-3: DNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: DNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.30 DNA bloting gel ของ chitinase จากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) DNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิฮิการิ 105 อายุ 2 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I แล้วย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

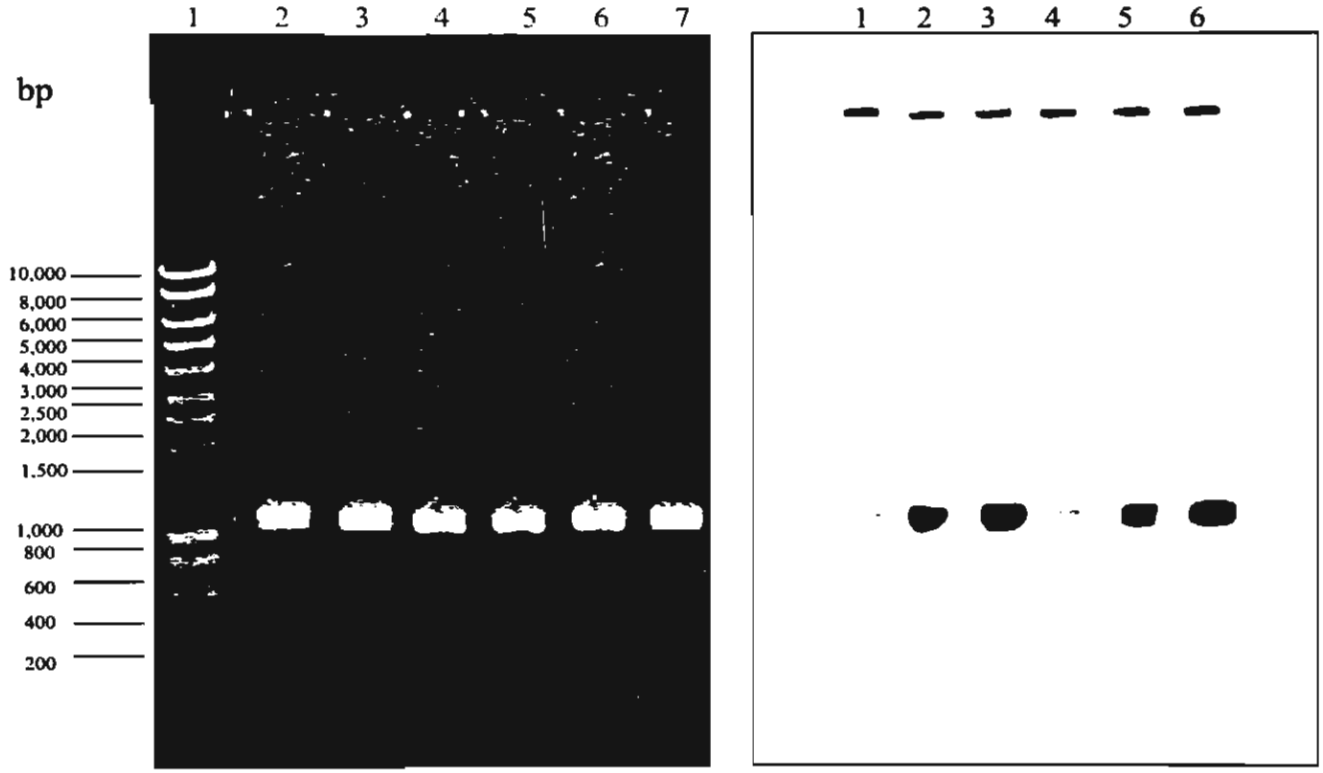
Lane 2-4: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-7: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

(ข) DNA bolting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ อายุ 2 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I

Lane 1-3: DNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: DNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ



ภาพที่ 4.31 DNA bloting gel ของ chitinase จากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) DNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิฮิการิ 105 อายุ 3 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I แล้วย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 8: Ladder I DNA maker

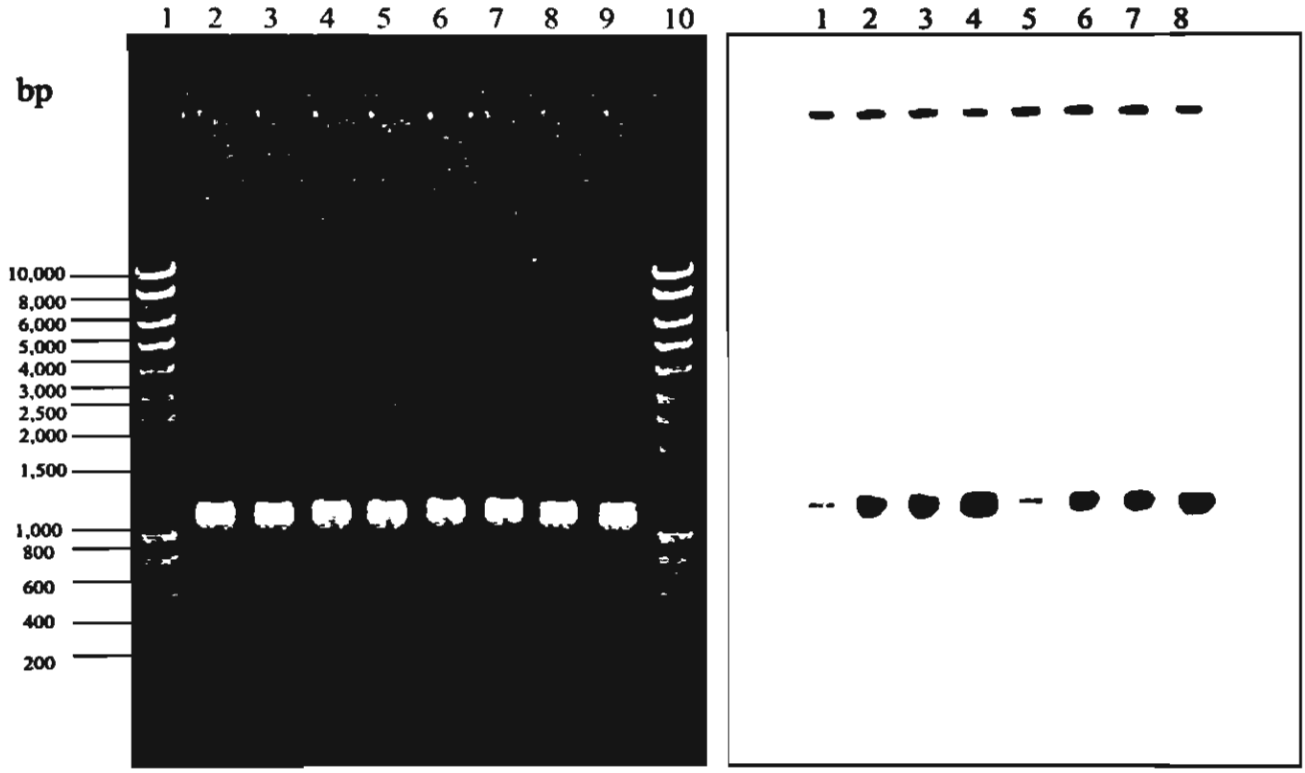
Lane 2-4: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-7: DNA จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

(ข) DNA bolting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ อายุ 3 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I

Lane 1-3: DNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 4-6: DNA bolting gel จากราก ต้น และใบของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ



ภาพที่4.32 DNA bloting gel ของ chitinase จากส่วนต่างๆ ของข้าว

(ก) DNA ของข้าวดอกมะลิและข้าวโกชิฮิการิ 105 อายุ 4 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I แล้วย้อมด้วย ethidium bromide

Lane 1, 10: Ladder I DNA maker

Lane 2-5: DNA จากราก ต้นใบ และเมล็ดของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 6-9: DNA จากราก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

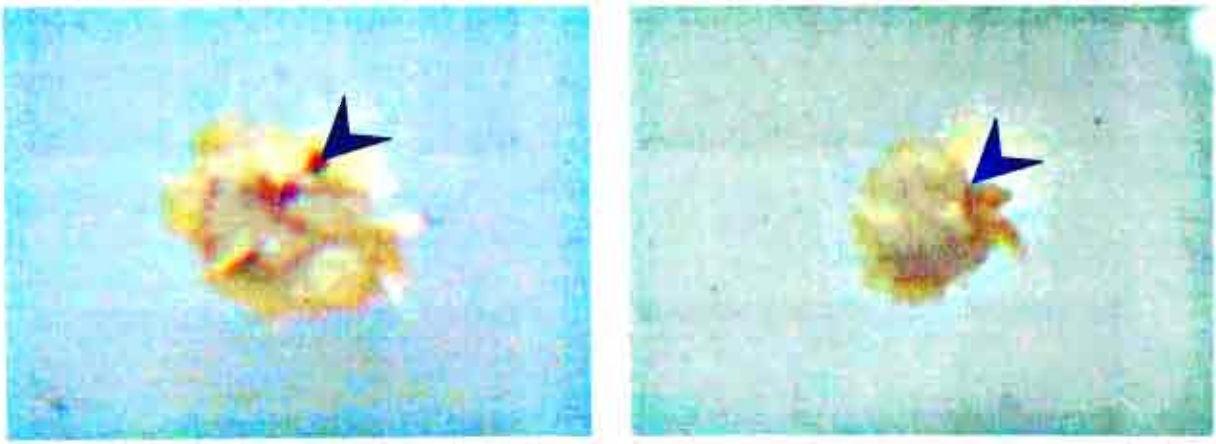
(ข) DNA bolting gel ของดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ อายุ 4 เดือน ที่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ *Bam* HI และ *Sac* I

Lane 1-4: DNA bolting gel จากราก ต้นใบ และเมล็ดของข้าวดอกมะลิ 105 ตามลำดับ

Lane 5-8: DNA bolting gel จากราก ต้น ใบ และเมล็ดของข้าวโกชิฮิการิ ตามลำดับ

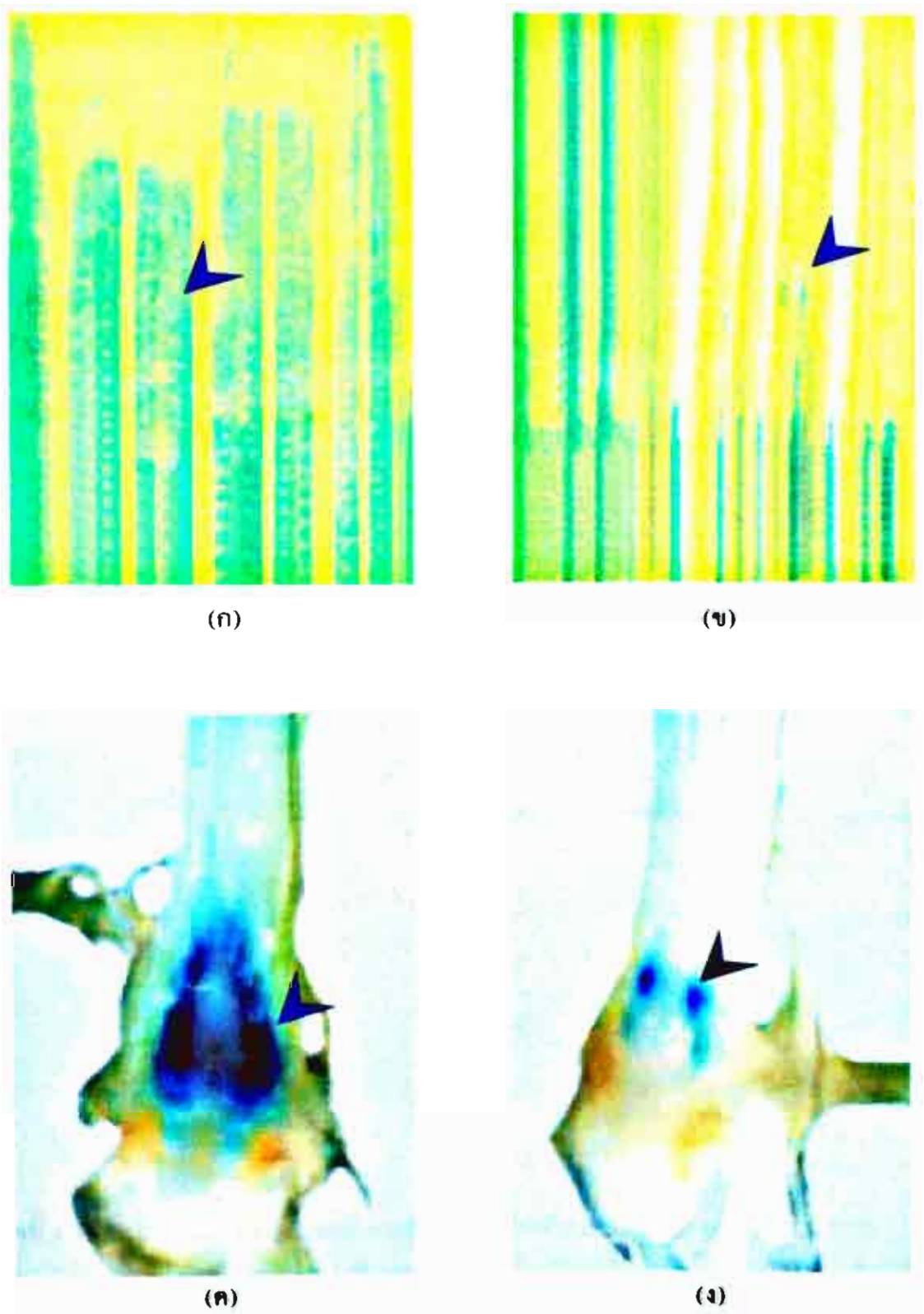
ผลการทดสอบการแสดงออกของยีน gus โดยใช้วิธี gus assay

จากการตรวจสอบการแสดงออกในส่วนต่างๆ ของไคติเนสในข้าวโดยการหา gus gene ที่มีในพลาสมิด pCAMBIA 1301 ซึ่งถ่ายลงไปในแคลลัสข้าว พบว่ามียีน gus ตั้งแต่เริ่มการถ่ายยีนเข้าแคลลัสทั้งข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ โดยในแคลลัสของข้าวดอกมะลิ 105 จะมี gus gene ที่ชัดเจนกว่า ดังภาพที่ 4.33 ส่วนในใบ ต้น ราก และเมล็ด ของข้าวดอกมะลิ 105 ก็จะมี gus gene ชัดเจนและมากกว่า ในข้าวโกชิฮิการิ ดังภาพที่ 4.34 และภาพที่ 4.35

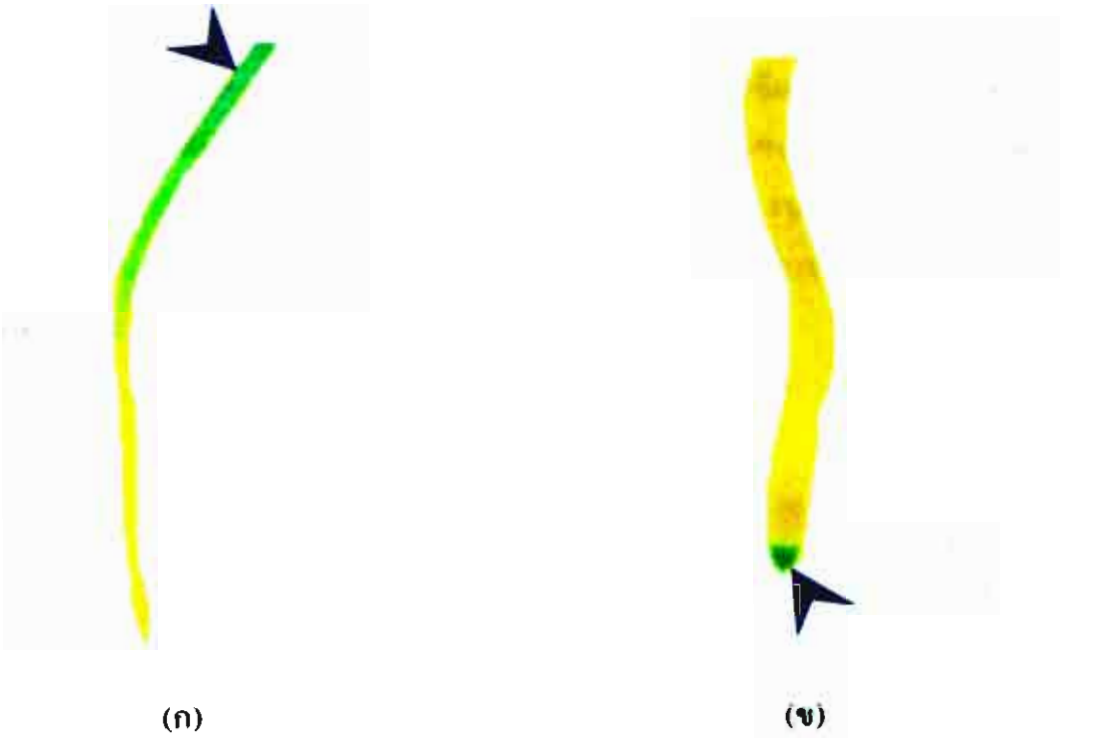


(ก) (ข)

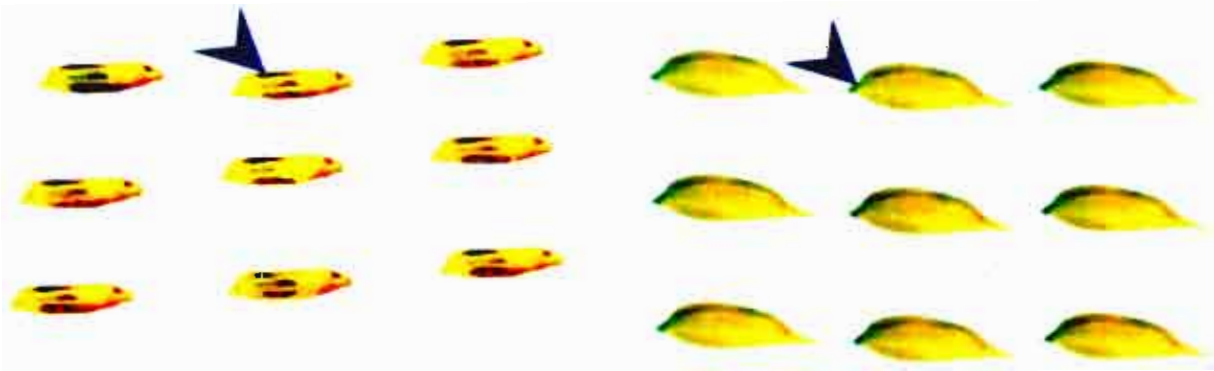
ภาพที่ 4.33 จุดสีน้ำเงินของ gus gene จากแคลลัสข้าวอายุ 1 เดือน ที่มีการถ่ายพลาสมิด control pCAMBIA 1301 (ก) แคลลัสจากข้าวดอกมะลิ 105 และ (ข) แคลลัสจากข้าวโกชิฮิการิ



ภาพที่ 4.34 จุดสีน้ำเงินของ gus gene จากส่วนของข้าวที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1301
(ก) ใบของข้าวดอกมะลิ 105 อายุ 4 เดือน และ (ข) ใบของข้าวไกชิอิการิ อายุ 4 เดือน
(ค) ต้นของข้าวดอกมะลิ 105 อายุ 4 เดือน และ (ง) ต้นของข้าวไกชิอิการิ อายุ 4 เดือน



(ก) (ข)

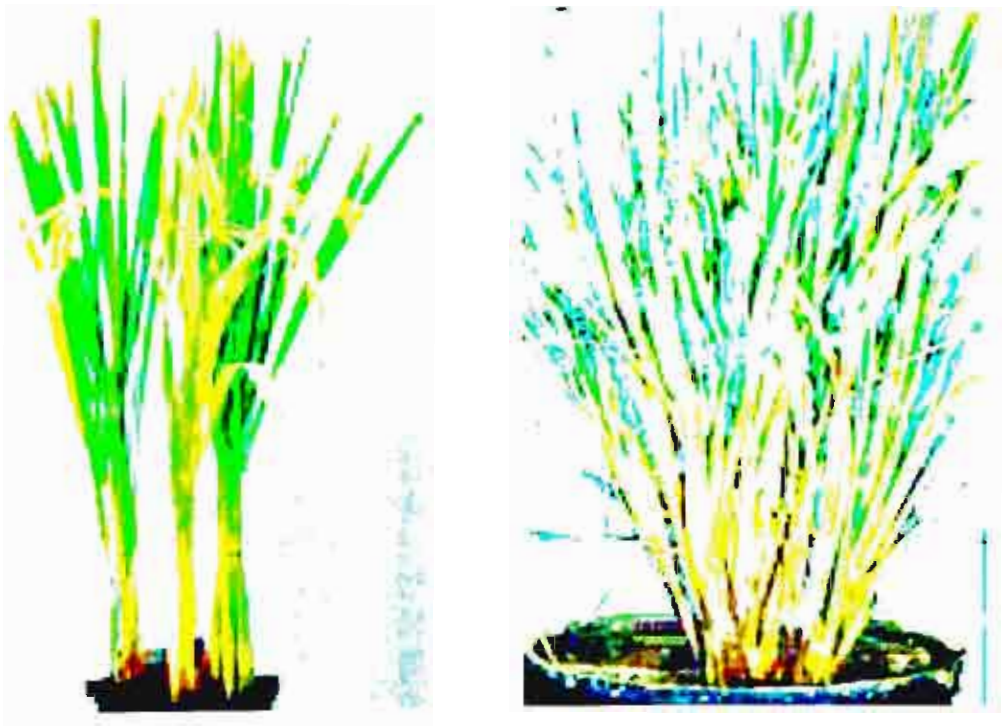


(ค) (ง)

ภาพที่ 4.35 จุดสีน้ำเงินของ gus gene จากส่วนของข้าวที่ถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1301
(ก) รากของข้าวดอกมะลิ 105 อายุ 4 เดือน และ (ข) รากของข้าวไกชิอิการิ อายุ 4 เดือน
(ค) เมล็ดของข้าวดอกมะลิ 105 อายุ 4 เดือน และ (ง) เมล็ดของข้าวไกชิอิการิ อายุ 4 เดือน

การต้านทานเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium monoliforme* ของต้นข้าว

จากการที่นำเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium monoliforme* มาฉีดพ่นบนต้นข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิที่มีอายุ 4 เดือน เปรียบเทียบกับต้นข้าวที่ไม่ได้มีการฉีดพ่นเชื้อรา ดังภาพที่ 4.36 พบว่า ต้นข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ จะเริ่มมีใบสีเหลืองจากจากฉีดพ่นเชื้อราไป 3 วัน จากต้นข้าวดอกมะลิ 105 และต้นข้าวโกชิฮิการิใบจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและเหี่ยวตายในที่สุด ภายใน 14 วันและ 10 วัน ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.37

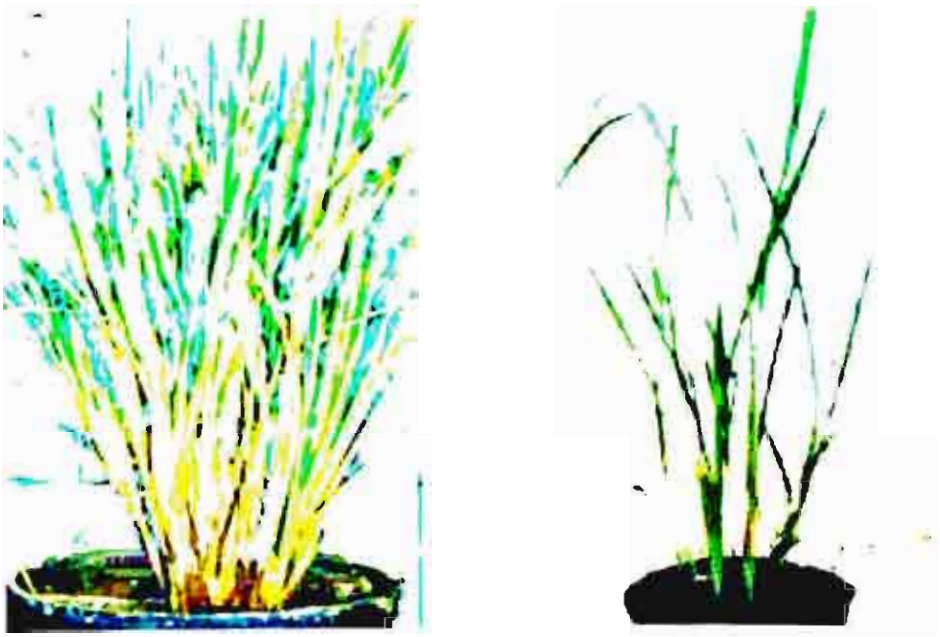


(ก) (ข)

ภาพที่ 4.36 ต้นข้าวก่อนการฉีดพ่นเชื้อรา (ก) ข้าวดอกมะลิ 105 (ข) ข้าวโกชิฮิการิ

(ก) (ข)

ภาพที่ 4.37 ต้นข้าวหลังการฉีดพ่นเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium monoliforme* ได้เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ข้าวดอกมะลิ 105ที่ยังไม่ได้พ่นเชื้อรา (ข) ข้าวดอกมะลิ 105 ที่พ่นเชื้อรา



(ก) (ข)

ภาพที่ 4.38 ต้นข้าวหลังการฉีดพ่นเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium monoliforme* ได้เป็นระยะเวลา 7 วัน (ก) ข้าวโกชิฮิการิที่ยังไม่ได้พ่นเชื้อรา (ข) ข้าวโกชิฮิการิที่พ่นเชื้อรา

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย

1. เปอร์เซ็นต์การเกิดแคลลัส การเจริญของแคลลัสเป็นราก และต้นของข้าวดอกมะลิ 105 เท่ากับ 97.5, 86.75 และ 74.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซนต์การเกิดแคลลัสเป็นรากและต้นของข้าวโกชิฮิการินั้นมีเปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าคือ เท่ากับ 82.41, 73.25 และ 63.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2. เปอร์เซ็นต์ของการถ่ายพลาสมิด pCAMBIA 1300 และ pCAMBIA 1301 เข้าไปในข้าวดอกมะลิ 105 สูงกว่าข้าวโกชิฮิการิคือ เท่ากับ 55 เปอร์เซ็นต์ และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการเกิดราก ส่วนการเกิดต้นสีเขียวเท่ากับ 36 และ 26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

3. เปอร์เซ็นต์ในการถ่ายยีนไคติเนสสู่เข้าดอกมะลิ 105 สูงกว่าข้าวโกชิฮิการิคือ เท่ากับ 54.67 เปอร์เซ็นต์ และ 42.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในการเกิดราก ส่วนการเกิดต้นสีเขียวเท่ากับ 30 และ 22 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าในการถ่ายพลาสมิด 1300+chitinase มีเปอร์เซ็นต์การเกิดน้อยกว่าการใช้พลาสมิด 1301 อาจเป็นเพราะว่า พลาสมิด pCAMBAI 1300 +chitinase มีขนาดใหญ่กว่าพลาสมิด pCAMBIA 1301

4. จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีนไคติเนสและยีน gus โดยวิธี Northern blot gel, Southern blot gel และ gus assay พบว่าการแสดงออกของไคติเนสในข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ จะมีการแสดงออกในทุกๆ ส่วนของข้าวทั้ง 2 ชนิด แต่จะมีการแสดงออกน้อยที่สุดในราก ส่วนใน ใบ ลำต้น และเมล็ดจะมีการแสดงออกของยีนไคติเนสและยีน gus มาก แสดงว่ายีนไคติเนสจะมีในใบ ต้น และเมล็ดมากกว่าในราก และในข้าวดอกมะลิ 105 จะมีการแสดงออกมากกว่าในข้าวโกชิฮิการิ ซึ่งจะเหมือนกับงานวิจัยของลี และคณะ (Li, *et. al.*, 1992) ที่พบว่าข้าวอินดิคาจะมีการแสดงออกของ gus มากที่สุด ซึ่งมากกว่าจาปอนิคาและกลาเบอริมา ถึง 2-3 เท่า

5. การเกิดโรคของเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium monoliforme* ในต้นข้าวทั้งข้าวสายพันธุ์ข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิ ที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนนั้นปรากฏว่าต้นข้าวที่ได้รับการสเปรย์เชื้อราทั้งสองสายพันธุ์หลังจากนั้นสองวันต้นข้าวมีลักษณะเหี่ยว ใบเริ่มเหลือง และเมื่อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ต้นข้าวเหี่ยว ใบเกิดจุดสีน้ำตาล เมื่อเทียบกับต้นข้าวทั้งสองสายพันธุ์ที่ไม่ได้ฉีดพ่นเชื้อรา แสดงให้เห็นว่าต้นข้าวที่ไม่มียีนของไคติเนส จะไม่สามารถต้านทานเชื้อรา จึงทำให้เกิดโรคเชื้อราในข้าวได้

ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวชนิดอื่น หรือเป็นพืชเศรษฐกิจเช่น ฝ้าย ปาล์ม หรือนำมาใช้ประโยชน์ในด้านสิ่งแวดล้อม เช่น พุทธรักษา

5.2.2 นำยีนถ่ายเข้าในข้าวดอกมะลิ 105 และข้าวโกชิฮิการิเพื่อศึกษายีนอื่นเพิ่มเติม เช่น ยีนผลิตวิตามิน ยีนต้านทานความแล้ง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ประภา ศรีพิจิตต์. (2532). **การชักนำให้เกิดยอดจำนวนมากจากการเพาะเมล็ดข้าวหอมในสภาพปลอดเชื้อ.วิทยาสารเกษตรศาสตร์** 28: 324-33.

สนธิชัย จันทร์เปรม ชัยกฤษ์ มณีพงษ์ และอรดี สหวัชรินทร์. (2528). **การคัดข้าวทนเค็มโดยวิธีเพาะเลี้ยงอับละอองเกสร. ในรายงานการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 23 สาขาพืช.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน, กรุงเทพฯ : 1-10.

อุดม นวพานิชย์ และ อรดี สหวัชรินทร์. (2523). **การเพาะเลี้ยงอับละอองเกสรของข้าว .** ในเรื่องย่อการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 18 สาขาพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน, กรุงเทพฯ :17.

Abel, T., and Futsuhara, Y. (1985). Efficient plant regeneration by embryogenesis from root callus tissue of rice (*Oryza sativa* L.) **J. Plant Phisiol.** 121, 111-118.

Ayres, M.D., Howard, S.C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., and Posee, R.D. (1994). The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. **Virology** 202: 586-605.

Balconi, C., Perugini, I., Castelletti, S., Reali,A., Russo, S., Chan.,M.T., and Lupotto, E. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated tranformatin of rice (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonnica*) Italian caltivars. Interaction among *Agrobacterium* strain end rice genotype in embryogenic callus of somatic and gametic origin. **J. Genet. Breed.** 52, 313-323.

Beintema, J.J. (1994). Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. **FEBS Letters** 350: 159-163.

Boissot, N., Valdez M., and Guiderdoni, E. (1990). Plant regeneration from leaf and seed-derived calli and supension cultures of the African perenial wild rice, *Oryza longistainata.* **Plant Cell Reports** . 9, 247-250.

Bol, J.F., Linthorst, H.J.M., and Cornelissen, B.J.C. (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annu Rev Phytophath** 28: 113-138.

Boller, T. (1987). Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. In: Kosuge T., Nester E.W. (eds) **Plant-Microbe Interactions**, vol 2. Molecular and Genetic Perspectives, pp. 385-413. Macmillan, New York.

Boller, T. (1988). Ethylene and the regulation of antifungal hydrolases in plants. **In Surveys of plant Molecular and Cell Biology**, Volume 5 (Miflin, B. J., ed.). Oxford: Oxford University Press, pp. 145-174.

Chagolla, A., Opedraza, M., and Lopez-Romero, E. (1987). Chitnolytic activity in cell-free extracts from mycelial cells of *Mucor rousii*. **Rev. Mex. Microbiol.** 3: 283-292.

Chan, M.T., Lee, T.M., and Chang, H.H., Tse-Min, L., and Hsin-Hsiung, C. (1992). Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) Mediated by *Agrobacterium tumerfaciens*. **Plant Cell Physoil** 33, 577-583.

Chu, C.C., Wang, C.S., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chy, C.Y., and Bi, F.Y. (1975). Establishment of an efficient medium for antherculture of rice though comparative experiment on the nitrogen sources. **Sci. Sinica.** 18, 959-668.

Collinge, D.B., Kragh, K.M., Mikkelsen, I.D., Nieler, K.K., Rasmussen, U., and Vad, K. (1993). Plant chitinases. **Plant J.** 3: 31-40.

Cornejo-Martin, M.J., and Primo-Millo. E (1981). Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.) **Euphytica** 30, 541-546.

Dun-Yi., and Krikorian, A.D. (1981). Multiplication of rice (*Oryza sativa* L.) from aseptically culture nodes. **Ann. Bot.** 48, 255-259.

Erik, J., Henk, T., Jeroen, S.C. van R., Sandra, A. Bres-V., Ilma, D., Peter, J.M. van den E., Ben, J.C.C., and Leo, S.M. (1995). Synergistic activity of chitinases and β-1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. **Euphytica** 85: 173-180.

Hakala, B.E., White, C., and Recklies, A.D. (1993). Human cartilage gp-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family. **J. Biol. Chem.** 268: 25803-25810.

Hartke, S., and Lorz, H. (1989). Somatic embryogenesis and plant regeneration from various indica rice genotype (*Oryza sativa* L.) **J. Genet. Breed.** 43, 205-214.

Henrissat, B. (1990). Weak sequence homoloies among chitinases detected by clustering analysis.**Protein Sequences Data Anal.** 3: 523-526.

Henrissat, B., and Bairoch, A. (1993). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochem. J.** 293: 781-788.

Humphreys, A.M., and Gooday. G.W., (1984). Phospholopid requirement of microsomal chitinase from *Mucor mucedo*. **Curr Microbiol.** 11: 187-190.

Jakopitsch, C., Ruker, F., Regelsberger, G., Dockal, M., Peschek, G.A., and Obinger, C. (1999). Catalase-peroxidase from the cyanobacterium Synechocystis PCC 6803: cloning, overexpression in *Escherichia coli*, and kenetic characterization. **Biol. Chem.** 380(9): 1087-1096.

Kaomek, M. (2002). Cloning, Expression, and Usage of Chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit. Ph. D. Thesis. Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, Thailand.

Kramer, K.J., Corpuz,L., Choi,H.k., and Muthukrishne, S. (1993). Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of Manduca sexta. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 23: 691-701.

Leah R., Tommerup H., Svendsen I., and Mundy J. (1991). Biochemical and Molecular characterization of three barley seed proteins with anti-fungal properties. **J. Biol. Chem.** 266: 1564-1573.

Li, X.Q., Liu, C.N., Ritichie, S.W., Peng J.Y., Gelvin S.B., and Hodges, T.K. (1992). Factors influencing *Agrobacterium*–mediated transient expession of gus A in rice. **Plant Mol. Biol.** 20, 1037- 1048.

Linthorst, H. J. M., (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. **Crit. Rev. Plant Sci.** 10: 123-150.

Mauch, F., Hadwiger, L.A., and Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue. I. Purification and Characterization of twochitinases and two 1,3- glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. **Plant Physiol.** 87: 325-333.

Menis, F.Jr, Fritig, B.J., Linthorst, H.J.M., Mikkelsen, J.D., Neuhaus, J.M., and Ryals, J. (1994). Plant chitinase genes. **Plant Mol. Biol. Rep.** 12: S22-S28.

Morgavi, D.P., Sakurada, M., Tomita, y., and Onodera, R. (1994). **Microbiology** 140: 631-636

Samac, D.A., Mohnen, D.M., and Menis, F., (1991). Developmental and pathogen induced activation of the Arabidopsis acidic chitinase promoter. Plant **Cell** 3: 1063-1072.

Schlumbaum A., Mauch F., Vogeli U., and Boller T. (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature** 324: 365-367.

Urashibara, S., Tazawa, Kawakishi Y., Kobayashi, M., and Wakasa, K. (2001). Efficient Tranformation of Suspension-culture Rice Cell Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Breed Science.** 51, 33-38.

Vajrabhaya, M., Ttunvachkul., and Vajabhaya, T. (1986). Effect of auxin and cytokinin of plant regeneratio from rice callus. **J. Sci. Res. Chula. Univ.** 11, 113-115.

Wu, L., and Li, H.W. (1970). Introduction of callus tissues initiation from different somatic organs of plant By various concentration of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid. **Cytologia.** 36, 411-416.

Yatazawa, M., Furuhashi, K., and Shimizu, K. (1967). Growth of callus tissue from rice-root in vitro. **Plant Cell Physiol.** 8, 363-373.

Ye-Yen, Z. and Zamir, K.P. (1994). Induction and characterization of chitinas cucumber (*Cucumis sativus* L.): effect of elocitors, wounding and pathoge **Plant Science.** 99: 141-150.

Zimmy, J., and Lorz , H. (1986). Plant regeration and initiation of all suspension from root-tip derived callus of *Oryza sativa* L. (rice). **Plant Cell Reports.** 5, 89-92.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. อาหารเหลว LB-broth/L

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	5 กรัม

2. อาหารแข็ง LB-plate/L

Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
Agar	15 กรัม

3. AB medium

	(mg/L)
K_2HPO_4	1,500
NaH_2PO_4	200
NH_4Cl	1,000
$MgSO_4.7H_2O$	300
KCl	150
$CaCl_2.2H_2O$	150
$FeSO_4.7H_2O$	2.5
Glucose	5,000
Agar	1,500

Adjust pH 7.2

Autoclave at 121 $^{\circ}C$ for 20 min

4. AAM medium

AA macronutrients	**mg/L**
$NaH_2PO_4.2H_2O$	150
$MgSO_4.7H_2O$	250
KCl	3,000
$CaCl_2.2H_2O$	150
AA micronutrients	**mg/L**
$MnSO_4.4H_2O$	10
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25
H_3BO_3	3
$ZnSO_4.7H_2O$	2
$CuSO_4.5H_2O$	0.0387
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
KI	0.75
AA iron Fe	**mg/L**
$FeSO_4.7H_2O$	28
AA Vitamin	**mg/L**
Myo-Inositol	100
Nicotin acid	0.5
Pridoxin HCl	0.5
Thiamin HCl	0.5
AA amino acid	**mg/L**
L-Glycine	7.5
L-Arginine	174
L-Glutamine	876
Casamino acid	500
Sucrose	68,500
Glucose	35,000

Adjust pH 5.2

Autoclave 120^{o}C for 20 min. Add acetocyringone 100 µM

5. NB medium

Solution N6 Macronutrients	**mg/L**
KNO_3	2,830
$(NH_4)SO_4$	463
KH_2PO_4	460
$CaCl_2.2H_2O$	166
$MgSO_4.7H_2O$	185
Solution B5 micronutrients	**mg/L**
KI	0.75
H_3BO_3	3
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$MnSO_4.7H_2O$	10
$ZnSO_4.7H_2O$	2
$Na_2MoO_4.7H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
Solution FeEDTA	**mg/L**
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3
Solution B5 Vitamin	**mg/L**
Myo-Inositol	100
Nicotin acid	1
Pridoxin HCl	1
Thiamin HCl	10
Amino acid	**mg/L**
Casein hydrolysate	300
L-Proline	500
L-Glutamine	500
Sucrose	30,000
Agar	8,000

Adjust pH = 5.8

6. 2NB medium (calli induction medium)

Solution N6 Macronutrients	**mg/L**
KNO_3	2,830
$(NH_4)SO_4$	463
KH_2PO_4	460
$CaCl_2.2H_2O$	166
$MgSO_4.7H_2O$	185
Solution B5 micronutrients	**mg/L**
KI	0.75
H_3BO_3	3
$CoCl_2.6H_2O$	0.025
$MnSO_4.7H_2O$	10
$ZnSO_4.7H_2O$	2
$Na_2MoO_4.7H_2O$	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
Solution FeEDTA	**mg/L**
$FeSO_4.7H_2O$	27.8
$Na_2EDTA.2H_2O$	37.3
Solution B5 Vitamin	**mg/L**
Myo-Inositol	100
Nicotin acid	1
Pridoxin HCl	1
Thiamin HCl	10
Amino acid	**mg/L**
2,4-D	2
Casein hydrolysate	300
L-Proline	500
L-Glutamine	500
Sucrose	30,000
Agar	8,000

7. 2NB-AS medium (co-cultivation medium)

2NB media supplemented with

sucrose	30 g/L
glucose	10 g/L
autoclave 121°C for 15 min	
add acetosyringone 100 μM	
pH 5.2	

8. R_2 medium

R_2 macro element	**mg/L**
KNO_3	2,830
$(NH_4)SO_4$	463
KH_2PO_4	460
$CaCl_2.2H_2O$	166
$MgSO_4.7H_2O$	185
R_2 micro element	**mg/L**
H_3BO_3	2.83
$MnSO_4.7H_2O$	1.6
$ZnSO_4.7H_2O$	2.2
$Na_2MoO_4.7H_2O$	0.125
$CuSO_4.5H_2O$	0.195
Solution FeEDTA	**mg/L**
$FeSO_4.7H_2O$	12.5
$Na_2EDTA.2H_2O$	1.7
LS Vitamin	**mg/L**
Thiamin HCl	1

9. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์ *Fusarium monoliforme*

ชั่ง Potato Dextrose Agar 39 กรัม ต่อน้ำ 1,000 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. การเตรียมสารละลาย Dioctyl sulfosuccinate

เตรียมสารละลาย Dioctyl sulfosuccinate เข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ชั่งสาร 1.05 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

11. การเตรียมสารละลาย gus

เตรียมสารละลายปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยผสมสารต่อไปนี้

0.1 M NaH2PO4	5 มิลลิลิตร
0.1 M NaH2PO4	5 มิลลิลิตร
10% Triton X-100	0.5 มิลลิลิตร
0.025 M Potassium fericyanide	1 มิลลิลิตร
0.025 M Potassium ferrocyanide	1 มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร	50 มิลลิลิตร
เติม X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide)	25 มิลลิกรัม

12. การเตรียม Competent cell ของอะโกรแบคทีเรียม

นำอะโกรแบคทีเรียมที่บรรจุ Ti plasmid ที่ถูกควบคุมอย่างเหมาะสมมาใส่ในอาหารสูตร LB bloth 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงข้ามคืนมา 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารสูตร LB bloth 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร และเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาทีที่ 28 องศาเซลเซียส (ประมาณ 2 ชั่วโมง) แล้วนำไปวัดที่ OD_{600} ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.5-1.0 แช่ในน้ำแข็ง 5 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เทสารละลายใสทิ้ง แล้ววนำตะกอนไปเติมสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารที่ได้มา 0.1มิลลิลิตร ใส่ลงไปใน prechilled eppendorf test tubes นำเซลล์ไปแช่แข็งที่ –80 องศาเซลเซียส

อะโกรแบคทีเรียม + Ti plasmid

↓

เติมอาหาร LB bloth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

↓ ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส

นำเชื้อที่เพาะเลี้ยงมา 2 มิลลิลิตร ในอาหาร LB bloth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

↓

นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

↓

วัดOD_{600} ให้ได้ค่าการดูดกลืนแ สง 0.5-1.0 นำไปเก็บในที่เย็น

↓

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

↓ ทิ้งสารละลายใสไป

ส่วนที่เหลือเติม 1 มิลลิลิตร ของ 20 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์

↓

ดูดสารที่ได้มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน หลอดเซนติฟิวจ์

↓ นำไปตรวจสอบพลาสมิดด้วย agarrose gel

นำเซลล์ที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

13. อีดีทีเอเข้มข้น 0.5 โมลาร์

ชั่งไดโซเดียมอีดีทีเอ (disodium ethyendiaminetetraacetic acid, dihydrate; MW 372.2 กรัมต่อโมล) หนัก 186.1 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 2,000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ทำให้ละลายโดยแท่งกวนแม่เหล็ก แล้วปรับพีเอชของสารละลายให้ได้ 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น หรือเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม แล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยวัดปริมาตร และทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

14. TE saturated phenol (pH9.0)

TE (pH 8.0)	300	มิลลิลิตร
Melted Phenol at 50°C	300	มิลลิลิตร
8-Hydroxyquinoline	4.5	กรัม

ผสมให้เข้ากันและเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส 1 คืน เทสารละลายข้างบนทิ้ง

15. การเตรียม competent cell ของเชื้อแบคทีเรีย *E.coli* DH5α

Steak DH5α on LB plate

↓

Transfer single colony to 3 ml of SOB(or LB) and growth at 37°C for 14 h.

↓

Transfer 1 ml of culture into 100 ml of SOB flask (size 500 ml)

↓

Growth at room temperature and shaking about 55-70 rpm unit OD=0.5 (about 10 h.)

↓

Transfer into sterile centrifuge tube (autoclave)

↓ Chill on ice for 10 min

↓ Centrifuge at 3,000 rpm for 10 min at 4 °C

↓ Discard supernatant

Resuspend cell in 5 ml of TB(ice cold) after add 10 ml of TB(total 15 ml)

↓ Chill on ice at 4 °C for 10 min(ice + water)

↓ Combine cell to one tube

↓ Centrifuge at 3,000 rpm for 10 min at 4 °C

↓ Discard supernatant

Resuspend cell in 8.37 ml of TB(ice cold) and add 630 µl of dimethyl sulfoxide

↓

Transfer 300 µl of cell to eppendorf tube chill on ice

↓

Store at –70 °C

16. สารละลาย CH_3COOK เข้มข้น 3 โมลาร์ pH4.8

5 M CH_3COOK (510 g/l)	120 ml
Glacial acetic acid	23 ml

ปรับพีเอชเป็น 4.8 ด้วยกรดอะซิติกและปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

17. Stacking gel SDS-PAGE 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

1.0 M Tris (pH 6.8)	0.63 ml
dH_2O	3.4 ml
10% SDS	0.05 ml
30% acrylamide solution	0.83 ml
10% ammonium persulfate	0.05 ml
TEMED	0.005 ml

18. สารละลาย SSC 20X

Sodium chloride	175.3 g
Sodium citrate	88.2 g
Distilled water	800 ml

ปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

19. Phenol / Chloroform

TE (pH 8.0)	300 ml
Melted Phenol at 50°C	300 ml
8-Hydroxyquinoline	4.5 g

เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืนเทของเหลวด้านบนออก แล้วเติมคลอโรฟอร์ม 300 มิลลิลิตร

20. TE 10 mM pH 8.0

Tris (10 mM)	0.121 g
EDTA (1 mM)	0.3722 g
water	80 ml

ปรับพีเอชเป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

21. 10 M LiCl (1 l)

LiCl	423.90 g

ปรับปริมาตรเป็น 1ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที

22. สารละลาย CTAB เข้มข้น 2X ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2% Cetyltrimethylamonium bromide (CTAB)	
0.1 M Tris/HCl (pH 9.5)	1.21 g
20 mM EDTA	7.44 g
1.4 M NaCl	8.19 g

ปรับปริมาตรเป็น 99 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 40 นาที เติม β-mercaptoethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

23. สารละลาย chloroform : Isoamylalcohol 24:1

Chloroform	960 ml
Isoamyalcohol	40 ml

24. สารละลาย TAE เข้มข้น 10X

Tris	48.4 g
Glacial acetic acid	11.42 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	20.0 ml

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

25. สารละลายในการสกัด DNA (Gilbert buffer) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

0.5 M $AcONH_4$	7.7 g
10 mM $MgCl_2$	0.41 g
1 mM EDTA	0.07 g
0.1 % SDS	0.29 g

ปรับปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

26. DEPC treated water

เติม diethyl pyrocarbonate (DEPC) 0.1 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปเขย่าข้ามคืน แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

27. LB plate

Bacto Tryptone	10 g
Bacto Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g

เติมน้ำ 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.2 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

ภาคผนวก ข

ภาพที่ ข.1 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)

ภาพที่ ข.2 ตู้อบ (hot air oven)

ภาพที่ ข.3 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow biohazard cabinet)

ภาพที่ ข.4 ตู้เพาะเมล็ดพันธุ์ (growth chamber)

ภาพที่ ข.5 เครื่องเขย่า (incubator shaker ; orbital)

ภาพที่ ข.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (UV-visible spectrometer)

ภาพที่ ข.7 เครื่องเขย่าปรับอุณหภูมิ (refrigerated incubator shaker)

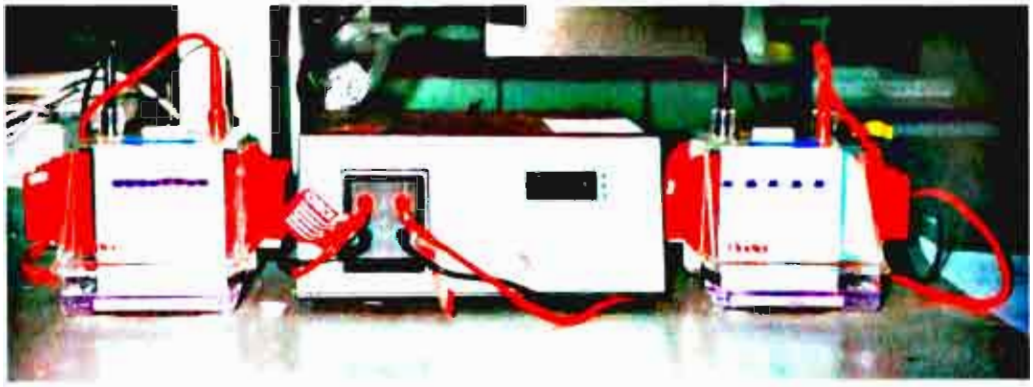
ภาพที่ ข.8 เครื่องชั่งสาร (balance)

ภาพที่ ข.9 เครื่องเขย่าสาร (vortex mixer)

ภาพที่ ข.10 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (polymerase chain reaction; PCR)

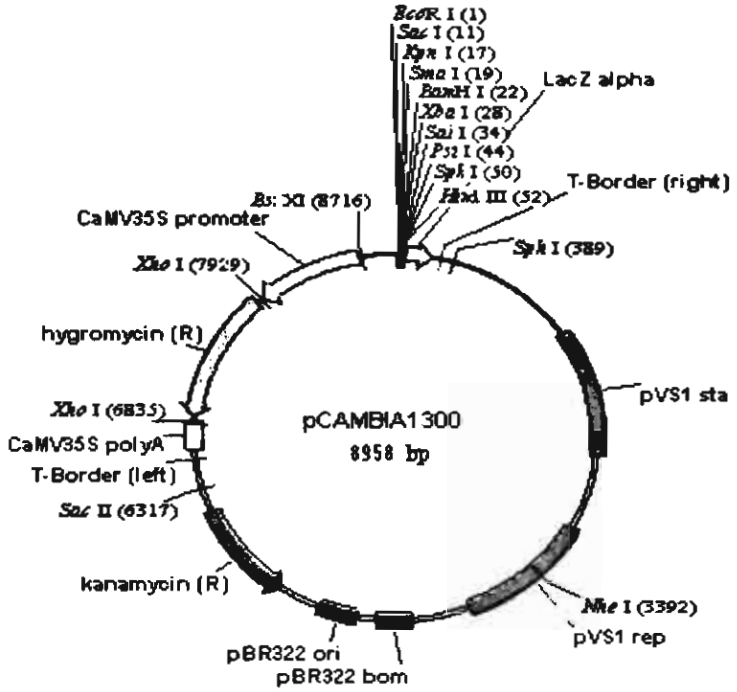
ภาพที่ ข.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสารปรับอุณหภูมิได้ (refrigerated centrifuge)

ภาพที่ ข.12 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกสาร (centrifuge)

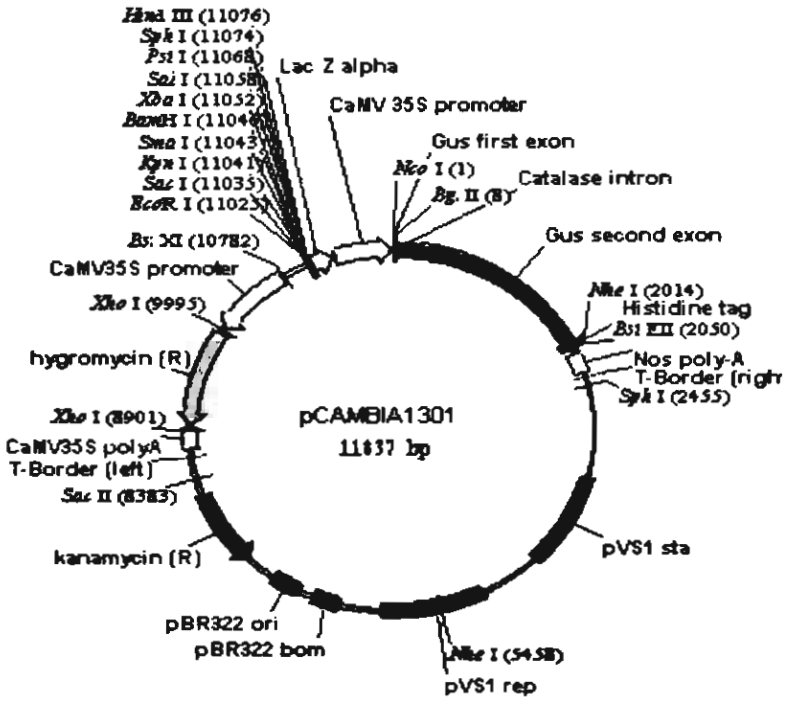


ภาพที่ ข.13 เครื่องแยกโปรตีนโดยกระแสไฟฟ้า (electrophoresis)

ภาพที่ ข.14 เครื่องถ่ายรูปเจล (gel document)



ภาพที่ ข.15 พลาสมิด pCAMBIA 1300



ภาพที่ ข.16 พลาสมิด pCAMBIA 1300 + Chitinase

Output
จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุน สกอ. และ สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ

ชื่อผู้แต่ง Mana Kaomek and James Ketudat-Cairns

ชื่อเรื่อง Expression of chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit in Thai rice (Indica rice) and Japonica rice.

ชื่อวารสาร Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry

รายละเอียด กำลังรอการตอบรับ

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

2.1 เชิงพาณิชย์ ไม่มี

2.2เชิงนโยบาย ไม่มี

2.3 เชิงสาธารณะ ไม่มี

2.4 เชิงวิชาการ

- นำไปดัดแปลงในการทำวิจัยของนักศึกษาระดับปริญญาตรี และปริญญาโท สาขาวิชาเคมี และชีววิทยาประยุกต์

3. อื่นๆ

3.1 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

- Kaomek, M. & Ketudat-Cairns, J.R. (2004). **Expression of chitinase from Leucaena leucocephala de Wit in Khaw Dao Mali 105.** In Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand. 19-21 October 2004. p. 33. Impact exhibition and Convention Centerl, Muang Thong Thani, Nonthaburi, Thailand.

- **Expression of chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit in Thai rice (Indica rice) and Japonica rice.** ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 9-11 มกราคม 2547. โรงแรมเฟลิกซ์ รีเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี.

3.2 การนำเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

- ไปเสนอผลงานวิจัยในประเทศ ในการประชุมวิชาการ วทท. ครั้งที่ 30. ในระหว่างวันที่ 19-21 ตุลาคม 2547, ณ เมืองทองธานี จ.นนทบุรี

3.3 หนังสือ ไม่มี

3.4 การจดสทธิบัตร ไม่มี

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ

- Kaomek, M. & Ketudat-Cairns, J.R. (2004). **Expression of chitinase from Leucaena leucocephala de Wit in Khaw Dao Mali 105.** In Proceeding of the 30th Congress on Science and Technology of Thailand. 19-21 October 2004. p. 33. Impact exhibition and Convention Centerl, Muang Thong Thani, Nonthaburi, Thailand.

- **Expression of chitinase from *Leucaena leucocephala* de Wit in Thai rice (Indica rice) and Japonica rice.** ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยของนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. 9-11 มกราคม 2547. โรงแรมเฟลิกซ์ รีเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี.

บทคัดย่อ
ABSTRACTS

การประชุมวิชาการ
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 30

19-21 ตุลาคม 2547

ณ ศูนย์แสดงสินค้าและการประชุมอิมแพ็ค เมืองทองธานี

30th Congress on Science and Technology of Thailand

19-21 October 2004

Impact Exhibition and Convention Center , Muang Thong Thani

สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
THE SCIENCE SOCIETY OF THAILAND
UNDER THE PATRONAGE OF HIS MAJESTY THE KING

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
FACULTY OF SCIENCE
SRINAKARINWIROT UNIVERSITY

[2]Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd.,Klong 1, Klong Luang, Phathumthani 12120, Thailand;
[3]Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330,Thailand; e-mail: sirawut@biotec.or.th

Abstract: RT-PCR was carried out for identification of sex-specific/differential expression in ovaries and testes of *P. monodon*. A 920 bp product specifically expressed in ovaries (PMscnDNA1) was cloned and sequenced. A primer pair was designed. RT-PCR still revealed a female-specific expression pattern of this marker. Polymorphism of PMscnDNA1 was found when representative individuals of *P. monodon* were genotyped. This newly isolated marker was then used to examined genetic diversity and differentiation of *P. monodon* from main fisheries in Thai waters (Satun, Trang, Phangnga, Chumphon and Trat). The number of alleles per locus and observed heterozygosity of PMscnDNA1 were 6 alleles and 0.3043 – 0.5128, respectively. High genetic diversity within geographic samples but low degrees of genetic differentiation between geographic samples was observed in this species.

B0031-ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF GENE EXPRESSED IN OVARIES AND TESTES OF THE TROPICAL ABALONE *Haliotis asinina* BY cDNA SUBTRACTION

Piti Amparvup[1], Sirawut Klinbunga[2*], Anchalee Tassanakajon[3], Takashi Aoki[4], and Padermsak Jarayabhand[5,6]
[1]Program of Biotechnology, [3]Department of Biochemistry, [5]Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand,
[2]Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Patthumthani 12120, Thailand,
[4]Laboratory of Genome Science, Graduate School of Marine Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan 4-5-7, Tokyo 108-8477, Japan,
[6]Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
mail address: sirawut@biotec.or.th

Abstract: Subtractive cDNA libraries were established from ovaries and testes of the tropical abalone (*Haliotis asinina*). A total of 270 randomly selected clones were unidirectional sequenced. Results indicated that 71 clones (64.5%) and 56 clone (35.0%) of ovary (forward subtraction) and testis (reverse subtraction) libraries were homologues of known transcripts. Se related transcripts were predominated and the most abundant transcript in ovaries and testes of *H. asinina* was VCP41 an sperm lysin ESTs, respectively. The full length of sperm lysin cDNA was obtained and first isolated in *H. asinina* Expression of sex-related genes was further examined using RT-PCR. Female-specific expression was found fro homologues of VCP1, VCP3, VCP7, VCP49 and VTG1.

B0032-ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FEMALE-SPECIFIC EXPRESSION cDNA MARKERS I THE GIANT TIGER SHRIMP (*PENAEUS MONODON*)

Rungnapa Leelatanawit[1], Sirawut Klinbunga[2*], Padermsak Jarayabhand[4] and Piamsak Menasveta[2]
[1]Program of Biotechnology, [3]Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok,1033 Thailand;
[2]Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), NSTDA 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klongluang, Pathumthani 12120;
[4]Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand; e-mail addres sirawut@biotec.or.th

Abstract: Subtractive cDNA libraries of ovaries of the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*) were constructed. A total of clones were unidirectionally sequenced. Most of the expressed genes in ovaries encoded thrombospondin (TSP, 45 clone accounting for 28.7% of total expressed sequence tags, ESTs), peritrophin (17 clones, 10.8%) and unknown transcripts (76 clone 49.7%). Gender-specific expression of candidate sex-linked gene homologues was examined by RT-PCR. While peritrophin w expressed in both ovaries and testes, A TSP homologue revealed sex-specific expression in ovaries but not in testes of *monodon*. Semi-quantitative PCR indicated significant differences in expression levels of TSP in 4-month-old and broddstoc sized *P.monodon* ($P < ...$).

B0033-EXPRESSION OF CHITINASE FROM *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* DE WIT IN KHAO DAWK MAI 105

Mana Kaomek[1] and James R. Ketudat-Cairns[2]
[1]Program of Chemistry, Faculty of Science and Technology, Valaya-alongkorn Rajabhat University, Pathumthani, Thailand
[2]School of Biochemistry, Institute of Science, Suranaree University of Technology, Muang District, Nakorn Ratchasim Thailand,
E-mail address: kaomek@mail.vru.ac.th, cairns@ccs.sut.ac.th

B

Abstract: This research studied the expression of *Leucaena leucocephala* chitinase from Khao Dawk Mali 105. Plasmid was constructed by chitinase insertion into pCAMBIA 1300. It was compared with pCAMBIA 1301 contain a gus gene reporter gene under the control the 35s promoter. They were transformed into Khao Dawk Mali 105 calli by agrobacterium EHA 105 and grown on 2ND6. The percentage of calli Khao Dawk Mali 105 was 75.

B0034 Development of AFLP markers for fast-growing *Penaeus monodon*

APIRADEE RIENNUKOOL, BUSABUN CHAISALEE and Kanokporn Triwitayakorn*
Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom, 73170, Thailand
* Correspondence to: Kanokporn Triwitayakorn, E-mail: mbktw@mahidol.ac.th

Abstract : The black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, is one of the most economically important aquaculture species in Thailand. Farming of *P. monodon* has been facing several problems especially out break of diseases, poor farming management and broodstock limitation, resulting decreasing of shrimp products. To overcome the problems, applications of molecular biology and genetic seem to be one of the promising methods. In this project, the AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) technique was used to generate genetic markers that are specific to fast-growing and sex in the *P. monodon*. A total of 171 primer combinations of *Eco*RI-ANN/ *Mse*I-GNN and *Eco*RI-TNN/*Mse*I-GNN were used to screen 151 day-old shrimp samples which were classified into four groups according to their body weight and sex. The results showed 24 markers were derived from large shrimp, 21 from small shrimp, 17 from female sex and 10 from male sex. All identified AFLP markers will be converted to SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker in order to improve efficiency of the markers for a large scale application in Marker Assisted Selection Program (MAS). Moreover, the AFLPs will be useful for construction of genetic linkage map of the *P. monodon*.

B0035-MORPHOLOGY AND PALYNOLOGY OF KALA (*ALPINIA NIGRA*) IN KOKRET, PAKKRET DISTRICT, NONTHABURI PROVINCE

Kanokon Riwluang, Tian Kanpuy and Ratapol Sornprasert
Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Chandakasem Rajabhat University, Bangkok 10900, Thailand

Abstract: Morphology of Kalat (*Alpinia nigra*) in KoKret, PakKret District, Nonthaburi Province found that KoKret community call it "Naw Kala". The Kala is a herbaceous plant, grows well on riverside and can grow on land. The underground stem is a rhizome while the aerial stem is pseudostem with approximately 3.08 meters in hight. Leaf shape is oblong type. Inflorescence is penicle type with flowers bloom at the apices in floret has involucre bract constancy. The floret consists of three sepals are 3 lobes . It has three petals, which are white-green color and 3 lobes . The flat labellum is 4 lobes , light pink color.Placentation in the inferior ovary is axile placentation, which are 3 carpels. Simple fruit is berry Ripe fruit is black, round-shape. Seed is dry - brown with white aril.Floral formular is Φ ● $ca^{(3)}\,co^{(3)}\,s^{1}\,p^{3}$ .Palynology of Kala found that the pollen is monad, nonaperturate grain, with spheroidal shape, isopolar pole , inaperture , radial symmetry exine sculturing is echinate.

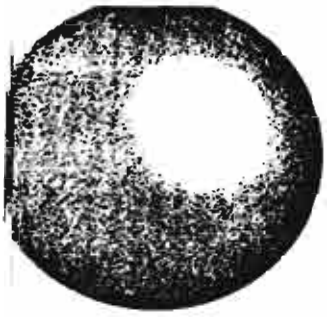
B0036-Molecular cloning and identification of superoxide dismutase and arginine kinase variants in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*.

Sansook Boonseub[1], Narongsak Puanglarp[2] and Piamsak Menasveta[2,3]
[1]Program of Biotechnology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand
[2]Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Phthumthani 12120, Thailand
[3]Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Abstarct: Superoxide dismutase (SOD) is an enzyme that reduces the toxic of oxidation in living organisms. Arginine kinase (AK) is an enzyme that plays a critical role as energy reserve. The activities of these enzymes are related to oxidative and osmotic stress in marine animals. In this study, cloning and sequencing of Mn-SOD, Cu/Zn SOD and AK were conducted. The identification of different forms of these enzymes in different tissues was also carried out using single stranded DNA conformation polymorphism (SSCP) technique. The result indicated that there were 4 variants of Mn-SOD while only 1 form of Cu/Zn-SOD and AK was observed. The complete DNA sequences from each form of these enzymes will be further determined. The result will help to develop primers more specific to each form of these enzymes. The activities of these enzymes can be measured and used as biomarkers for indication of stress condition in *Penaeus monodon*.

B0037-IDENTIFICATION OF SEX-SPECIFIC MARKERS FROM BLACK TIGER SHRIMP *Penaeus monodon* USING GENOMIC DNA SUBTRACTION

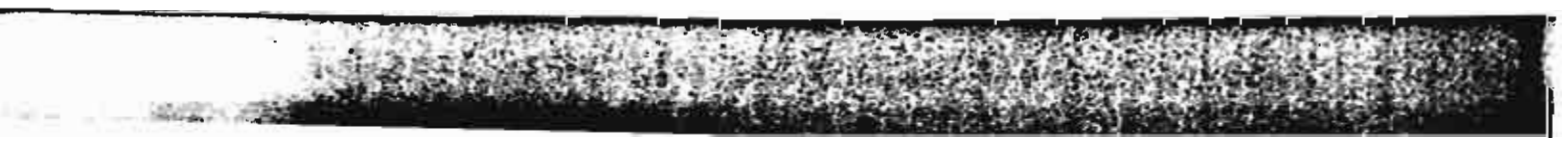
Srisupaph Poonlaphdecha[1], Narongsak Puanglarp[2] Sirawut Klinbunga[2] and Piamsak Menasveta[2,3]
[1]Program of Biotechnology, [2]Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
[3]Marine Biotechnology Research Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), 113 Paholyothin Rd., Klong 1, Klong Luang, Phthumthani 12120, Thailand



นักวิจัยรุ่นใหม่

พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว.

วันที่ 9-11 มกราคม 2547
ณ โรงแรมเฟลิกซ์ ริเวอร์แคว จังหวัดกาญจนบุรี



239	ดร.ผ่องเพ็ญ จิตอารีย์รัตน์	คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	pongphen.jit@kmutt.ac.th
240	ดร.พงศ์ธร ฐูปะเตมีย์	คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์	pongtorn@engr.tu.ac.th
241	ผศ.ดร.พงศ์ราม รามสูต	คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล	pongrama@yahoo.com
242	ผศ.ดร.พยงค์ วณิเกียรติ	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	scpawt@mahidol.ac.th
243	ดร.พรเพ็ญ ทับเปลี่ยน	คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ	nutsuda@swu.ac.th ptubplian@yahoo.com psrihan@hotmail.com prapapha@swu.ac.th
244	ดร.พรศักดิ์ ศรีอมรศักดิ์	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาศิลปากร	pornsak@su.ac.th
245	ดร.พรสวรรค์ กาญจนวณิชย์กุล	คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	kkpornsa@kmitl.ac.th
246	ดร.พรสวรรค์ พลอยแก้ว	คณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	JAMHAIDAI@hotmail.com jamhaidai@hotmail.com
247	ดร.พัชนี วิชิตพันธุ์	คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	faaspnv@ku.ac.th
248	ดร.พัชรินทร์ แสงจารึก	คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร	patch@swu.ac.th saengjaruk@yahoo.com
249	ดร.พานิช วุฒิพฤกษ์	คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ	pnv@kmitnb.ac.th
250	ดร.พินทุ์สุดา วีรวัฒน์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ptusu@yahoo.com
251	ดร.เพ็ญศิริ ทองผดุงโรจน์	คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ	pensiri@kmitnb.ac.th
252	ผศ.พ.ท.มหิรุทธ มุ่งถิ่น	วิทยาลัยแพทยศาสตร์พระมงกุฎเกล้า	mattrirut@pmk.ac.th
253	ดร.มณฑภรณ์ สุธีรวัฒนานนท์	โรงเรียนกายภาพบำบัด มหาวิทยาลัยมหิดล	monsuteerawa@yahoo.com
254	ภญ.ดร.มัลลิกา ชมนาวัง	คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	scmtd@mahidol.ac.th
255	ดร.มานะ ชาวเมฆ	คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สถาบันราชภัฏเพชรบุรีวิทยาลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์	kaomek@mail.ripw.ac.th
256	ผศ.ดร.มานะ อมรกิจบำรุง	คณะพลังงานและวัสดุ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	mana.amo@kmutt.ac.th
257	ดร.เมธา รัตนากรพิทักษ์	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร	mrutnakd@hotmail.com
258	ดร.ไมตรี อินทร์ประสิทธิ์	คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น	inprasitha@hotmail.com
259	ดร.ยุทธนา หมั่นดี	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	myuttana@hotmail.com
260	ดร.ยุทธนา ตันติรุ่งโรจน์ชัย	คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล	yt203@hotmail.com scytt@mahidol.ac.th
261	ดร.รัชดา เสือยันต์(เครสซี่)	คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ratchadasuaeyun@hotmail.com